



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΑΙΕΥΤΙΚΗ ΚΑΙ ΓΥΝΑΙΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Επίδραση του Λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA) στην
ωρίμανση ανώριμων ωαρίων (GV)

ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ ΔΡΑΧΜΑΝΗ
ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ
Σεπτέμβριος 2014

ΔΙΕΥΘΥΝΤΗΣ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ
ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Επιβλέπων: ΓΕΩΡΓΙΟΣ – ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΑΝΥΦΑΝΤΗΣ

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:
ΙΩΑΝΝΗΣ Ε. ΜΕΣΣΗΝΗΣ
ΝΙΚΟΛΑΟΣ ΒΑΜΒΑΚΟΠΟΥΛΟΣ

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Διευθυντή του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών Καθηγητή κ. Ιωάννη Μεσσήνη για τη συμβολή του και τη βοήθεια του σε όλον αυτό το χρόνο παρουσίας μας στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα. Θερμές ευχαριστίες στον επιβλέποντα αυτής της μεταπτυχιακής μελέτης κ. Ανυφαντή Γεώργιο - Σπυρίδωνα, όσον αφορά στην σωστή διεκπεραίωση της μεταπτυχιακής μελέτης. Ένα ευχαριστώ και στην κ. Φανή Μπουναρντζή, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Ιατρικής για τη βοήθεια της καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης. Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό της Μονάδας Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής για την άψογη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια της εκπόνησης αυτής της εργασίας. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και στήριξη τους σε όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Επίδραση του Λυσοφωσφατιδικού οξέος (LPA) στην ωρίμανση ανώριμων ωαρίων (GV)

Περίληψη

Η in vitro ωρίμανση ωαρίων είναι μια νέα τεχνική που μπορεί να βοηθήσει τα υπογόνιμα ζευγάρια στην τεκνοποίηση. Κατά τη διαδικασία αυτή ανώριμα ωάρια ανακτώνται από τις ωοθήκες και τοποθετούνται σε ειδικά καλλιεργητικά μέσα στο εργαστήριο με σκοπό την ωρίμανση τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο έλεγχος της επίδρασης του λυσοφωσφατιδικού οξέος στην ωρίμανση ανθρώπινων ανώριμων ωαρίων (GV) που ανακτήθηκαν μετά από ωοθηκική διέγερση.

Το λυσοφωσφατιδικό οξύ (1-ακυλ-2-υδροξυ-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό, LPA), ανήκει στην οικογένεια των φωσφολιπιδικών αυξητικών παραγόντων και δρα τόσο ως μιτογόνο όσο και ως αντιμιτογόνο στο κυτταρικό κύκλο. Παράγεται από διάφορα είδη κυττάρων και βρίσκεται σε πολλά βιολογικά υγρά όπως, το σάλιο, το ωοθυλακικό υγρό, το δάκρυ και το πλάσμα. Στο γυναικείο αναπαραγωγικό σύστημα ο ρόλος του είναι σημαντικός τόσο στη μεταφορά και εμφύτευση των εμβρύων όσο και στη δημιουργία του ωχρού σωματίου.

Στην παρούσα εργασία σε δείγματα απογυμνωμένων ανώριμων ωαρίων προστέθηκε λυσοφωσφατιδικό οξύ σε καλλιεργητικό μέσο (CSCC) σε συγκέντρωση 10^{-3} M και στη συνέχεια παρατηρήθηκε η επίδραση του στην ωρίμανση των δειγμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα μας δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστικά σημαντική επίδραση του LPA σε σύγκριση με την ωρίμανση ωαρίων σε καλλιεργητικό υλικό (CSCC) απουσία του. Σε συγκριτικές μελέτες που έγιναν και με άλλες έρευνες σε ζωικά μοντέλα καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι η απουσία των κοκκωδών κυττάρων, στα οποία και βρίσκονται υποδοχείς για το LPA, είναι ο λόγος που η προσθήκη του λυσοφωσφατιδικού οξέος δεν επηρέασε την ωοκυτταρική ωρίμανση στο εργαστήριο.

Λέξεις – κλειδιά: Λυσοφωσφατιδικό οξύ, in vitro ωρίμανση ωαρίων, GV ωάρια

Effect of Lysophosphatidic acid (LPA) in the maturation of immature oocytes (GV)

Abstract

In vitro maturation is a new technique that can help infertile couples at their effort for a child. During this process immature oocytes recovered from the ovaries and are placed for maturation in special culture media in the laboratory.

The purpose of this study is to test the effect of lysophosphatidic acid on the maturation of human immature oocytes (GV) retrieved after ovarian stimulation. Lysophosphatidic acid (1-acyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphate, LPA), belongs to the family of phospholipidic growth factors and acts both as a mitogen and as antimitogen in the cell cycle. It is produced by various cell types and is found in many biological fluids such as saliva, follicular fluid, tear and plasma. In the female reproductive system, its role is important in both the transportation and implantation of embryos and the creation of the corpus luteum.

In this study, samples of denudated immature oocytes are placed in culture medium (CSCC) where lysophosphatidic acid was added at a concentration of 10^{-3} M and then observed the effect of the maturation of the samples. According to our results there was no statistically significant effect of the addition of LPA in the rates of oocytes maturation compared with the rate of maturation in single culture medium (CSCC). In comparative studies with researches in animal models, it was concluded that the absence of granulosa cells where the receptors of LPA are founded is the reason for the lack of effect of the addition of LPA in the oocytes maturation.

Keywords: Lysophosphatidic acid (LPA), in vitro maturation, GV oocytes

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1. ΩΟΓΕΝΕΣΗ - ΩΟΘΥΛΑΚΙΟΓΕΝΕΣΗ	1
1.1.1. Ωοθυλακιογένεση	1
1.1.2. Ωογένεση.....	3
1.2. ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ – ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΣΥΜΜΕΤΕΧΟΥΝ	6
1.3. In vitro maturation.....	8
1.3.1 “Rescue” ωρίμανση ανώριμων ωαρίων in vitro	9
1.3.2. Κατηγορίες ασθενών στους οποίους εφαρμόζεται η in vitro ωρίμανση	10
1.3.3. Καλλιεργητικά μέσα για in vitro ωρίμανση	11
1.4. ΛΥΣΟΦΩΣΦΑΤΟΔΙΚΟ ΟΞΥ (LPA).....	16
1.4.1. Το LPA και οι υποδοχείς του	17
1.4.2. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ LPA	17
1.4.3. Το LPA στο αναπαραγωγικό σύστημα.....	19
1.5. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΟΥ LPA ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΩΑΡΙΩΝ IN VITRO.....	20
2. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	23
2.1. ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	23
2.2. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ LYSOPHOSPHATIDIC ACID (LPA) ΣΤΗΝ ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΑΝΩΡΙΜΩΝ ΩΑΡΙΩΝ	23
2.2.1. Υλικά και όργανα	23
2.2.2. Επιλογή προϊόντος LPA.....	23
2.2.3. Προετοιμασία αντιδραστηρίων	24
2.2.4. Αναλυτική τεχνική	25
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	28
3.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
3.3. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΑΝΑΜΕΣΑ ΣΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΜΕ ΠΡΟΣΘΗΚΗ LPA ΚΑΙ ΣΤΑ CONTROL.....	31
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	33
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	35

1. Εισαγωγή

1.1. Οογένεση - Ωοθυλακιογένεση

1.1.1. Ωοθυλακιογένεση

Τα θηλυκά γαμετικά κύτταρα βρίσκονται στην ωοθήκη με τη μορφή αρχέγονων ωοθυλακίων, τα οποία αποτελούνται από ένα μικρό, ανώριμο, μη αυξανόμενο ωάριο που περικλείεται από μια σειρά πλακωδών κοκκωδών κυττάρων. Κατά την αναπαραγωγική ηλικία των περισσότερων θηλαστικών, υπάρχει μια συνεχόμενη ροή αρχέγονων ωοθυλακίων τα οποία απελευθερώνονται από το λήθαργο και ξεκινάνε την ανάπτυξη. Από την εφηβεία και μετά, το ωοθυλάκιο εισέρχεται σε μια πολύπλοκη διαδικασία ανάπτυξης κατά τη διάρκεια της οποίας το ωοκύτταρο περνά από διάφορες φάσεις ανάπτυξης απαραίτητες για την επιτυχή ωορρηξία και γονιμοποίηση. Η διαδικασία αυτή ξεκινά από τη στιγμή που τα αρχέγονα ωοθυλάκια εγκαθίστανται στην ωοθήκη και συνεχίζεται μέχρι τα αποθέματα των ωοθηκών να εξαντληθούν, μια χρονική στιγμή που αντιστοιχεί με την εμμηνόπαυση. Είναι γνωστό ότι τα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της θήκης έχουν υποστηρικτικό για το ωοκύτταρο ρόλο με την παροχή των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, μεταβολικών προδρόμων ουσιών, αυξητικών παραγόντων και ορμονών (Brower and Schultz, 1982; Haghghat and Van Winkle, 1990). Είναι επίσης φανερό ότι το ίδιο το ωοκύτταρο παίζει ενεργό ρόλο στο να καθοδηγεί την ανάπτυξη του ωοθυλακίου μέσω της σύνθεσης παραγόντων που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη λειτουργία των κοκκωδών κυττάρων, τη στρατολόγηση των κυττάρων της θήκης και την έκκριση συστατικών της μήτρας (Eppig et al., 2002; Hussein et al., 2005).

Η προ-άντρου φάση της ωοθυλακιογένεσης χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία της διαφανούς ζώνης, τον πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων, την στρατολόγηση των κυττάρων θήκης στο βασικό έλασμα του ωοθυλακίου και την αύξηση του μεγέθους του ωοκυττάρου. Η φάση αυτή δεν εξαρτάται από τα εξω-ωοθηκικά ορμονικά ερεθίσματα (Kumar et al., 1997) και

η ρύθμισή της περιλαμβάνει κυρίως τις επιδράσεις ανάμεσα στο ωοκύτταρο και τα κοκκώδη κύτταρα και τους τοπικούς αυξητικούς παράγοντες, Πιο συγκεκριμένα δυο μέλη της οικογένειας του TGF παράγοντα είναι εκείνα που παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στην ανάπτυξη του ωοθυλακίου πριν το σχηματισμό του άντρου, ο GDF-9 και ο BMP-15 (Hanrahan et al., 2004).

Ενώ τα ωοθυλάκια πριν το σχηματισμό του άντρου εξαρτώνται μόνο από τους τοπικούς αυξητικούς παράγοντες, στην πορεία η κυκλική έκκριση των ορμονών της υπόφυσης, FSH και LH, είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του άντρου και τη φάση πριν την ωοθυλακιόρρηξη. Η δημιουργία του άντρου προωθείται από την FSH και συμπίπτει με την παύση στην ανάπτυξη του ωοκυττάρου, την απόκτηση της ικανότητας για ολοκλήρωση της μειωτικής διαίρεσης, τον συνεχόμενο πολλαπλασιασμό των κοκκωδών κυττάρων και τη διαφοροποίηση ανάμεσα στα κοκκώδη κύτταρα και τα κύτταρα της ακτινωτής στεφάνου (Li et al., 2000).

Τα πλήρως ανεπτυγμένα ωοκύτταρα επάγουν την μεταβολική υποστήριξη από τα κοκκώδη κύτταρα με την έκκριση παραγόντων που οδηγούν στην πρόσληψη αμινοξέων από τα κοκκώδη κύτταρα τα οποία στη συνέχεια μεταφέρονται στο ωάριο μέσω χασματοσυνδέσμων (Erpigg et al., 2005).

Η τελική φάση της ωοθυλακιογένεσης προωθείται από το κύμα τις LH που έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή ενός MII ωαρίου ικανό να γονιμοποιηθεί και να αναπτυχθεί σε έμβρυο. Η ανάπτυξη του γραφιανού ωοθυλακίου περιλαμβάνει την επανέναρξη της μείωσης, την κυτταροπλασματική ωρίμανση και τον τερματισμό της επικοινωνίας με χασματοσυνδέσμους ανάμεσα στο ωάριο και τα κοκκώδη κύτταρα (Erpigg et al., 1993). Το ωοκύτταρο συνεχίζει να παράγει παράγοντες που ρυθμίζουν την παραγωγή στεροειδών ορμονών (Vanderhyden et al., 1993) , υποδοχέων της LH και υαλουρονικού οξέος (Tirone et al., 1997). Επιπρόσθετα το ωοκύτταρο παράγει ουσίες που αναστέλλουν την ωχρινοποίηση μέχρι να συμβεί ωοθυλακιόρρηξη, καταστέλλοντας την παραγωγή προγεστερόνης (McNatty et al., 2005).

1.1.2. Ωογένεση

Τα αρχέγονα γεννητικά κύτταρα είναι υπεύθυνα για την παραγωγή γαμετών. Στη γαμετογένεση συμβαίνουν δυο βασικά γεγονότα: η μείωση και η διαφοροποίηση έτσι ώστε οι γαμέτες να αποκτήσουν τα εξειδικευμένα χαρακτηριστικά τους. Κατά τη μείωση λαμβάνουν χώρα δυο στάδια διαχωρισμού χρωμοσωμάτων, χωρίς ενδιάμεσο διπλασιασμό του γενετικού υλικού, ώστε να προκύπτουν σπερματοζωάρια και ωάρια με μειωμένο χρωμοσωμικό υλικό κατά το ήμισυ, γεγονός που μετά τη γονιμοποίηση οδηγεί σε αποκατάσταση του διπλοειδούς αριθμού χρωμοσωμάτων. Ενώ στη σπερματογένεση η διαφοροποίηση των σπερματοζωαρίων συμβαίνει μετά τη μείωση, στην ωογένεση η διαφοροποίηση συμβαίνει κατά τη διάρκεια της μειωτικής διαίρεσης γεγονός που κάνει αναγκαία την ύπαρξη σημείων παύσης και επανέναρξης της μείωσης. Τα διαφορετικά χαρακτηριστικά ωαρίων και σπερματοζωαρίων αντανακλούν τη διαφορετική συμβολή τους στη γονιμοποίηση και την πρώιμη εμβρυογένεση. Το ώριμο ωοκύτταρο περιέχει παράγοντες μητρικής προέλευσης που απαιτούνται από το έμβρυο ώσπου η αναπτυξιακή ρύθμιση να υπαχθεί σε ζυγωτικό έλεγχο, κάτι που σε κάποιους οργανισμούς μπορεί να συμβεί στο στάδιο των δυο κυττάρων ενώ σε άλλους μετά από 14 διαιρέσεις (Tadros et al., 2007).

Οι μηχανισμοί της ωογένεσης διαφέρουν ανάμεσα στα είδη πολύ περισσότερο από ότι εκείνοι της σπερματογένεσης. Σε μερικά είδη όπως τα βατράχια και οι αχινοί, τα θηλυκά παράγουν εκατοντάδες ή χιλιάδες ωάρια κάθε φορά ενώ σε άλλα είδη όπως τα περισσότερα θηλαστικά μόνο λίγα ωάρια θα παραχθούν κατά τη διάρκεια της ζωής ενός ατόμου. Στα είδη που παράγουν χιλιάδες ωαρίων, τα ωογόνια είναι αυτό-ανανεώσιμα βλαστικά κύτταρα. Στα άλλα είδη, που ανήκει και ο άνθρωπος, τα ωογόνια διαιρούνται μιτωτικά για ένα χρονικό διάστημα ώστε να παραχθεί ένας συγκεκριμένος αριθμός πρόδρομων κυττάρων που θα δώσουν ωάρια. Συγκεκριμένα στον άνθρωπο κατά την εμβρυική ζωή υπάρχει μια ταχύτατη αύξηση στις μιτωτικές διαιρέσεις των ωογονίων από τον δεύτερο ως τον έβδομο μήνα της κύησης, με αποτέλεσμα να καταλήξει σε ύπαρξη περίπου 7 εκατομμυρίων γεννητικών κυττάρων. Μετά

τον 7 μήνα της εμβρυικής διαφοροποίησης ο αριθμός των ωογονίων μειώνεται απότομα, με τα περισσότερα να μπαίνουν σε διαδικασία απόπτωσης ενώ τα εναπομείναντα εισέρχονται στην πρώτη μειωτική διαίρεση (Pinkerton et al. 1961). Αυτά ονομάζονται πρωτογενή ωοκύτταρα και αφού φτάσουν στο στάδιο της διπλοταινίας της πρώτης μειωτικής πρόφασης παραμένουν εκεί ως την εφηβεία. Με την έναρξη της ήβης, ομάδες αυτών των ωοκυττάρων περιοδικά ξεκινούν ξανά τη διαδικασία της μείωσης από το σημείο που είχε σταματήσει. Στην πραγματικότητα υπάρχουν κάποια ωοκύτταρα που παραμένουν στη μειωτική πρόφαση για περίπου 50 χρόνια, ενώ από τα εκατομμύρια των πρωτογενών ωοκυττάρων που υπάρχουν κατά τη γέννηση μόνο 400 περίπου ωριμάζουν κατά τη ζωή μιας γυναίκας.

Η μείωση κατά την ωογένεση διαφέρει από της σπερματογένεσης και όσο αναφορά την τοποθέτηση της μιτωτικής ατράκτου. Μετά τη διαίρεση του πρωτογενούς ωοκυττάρου έχουμε την διάσπαση του πυρήνα του (που ονομάζεται βλαστικό κυστίδιο (germinal vesicle) και η μιτωτική άτρακτος μεταναστεύει στην περιφέρεια του κυττάρου. Το ένα από τα δυο θυγατρικά κύτταρα δεν περιέχει σχεδόν καθόλου κυτταρόπλασμα και ονομάζεται πρώτο πολικό σωμάτιο ενώ το άλλο αποτελεί το δευτερογενές ωοκύτταρο. Κατά τη δεύτερη μειωτική διαίρεση λαμβάνει χώρα μια παρόμοια άνιση κυτοκίνηση με αποτέλεσμα το μεγαλύτερο μέρος του κυτοπλάσματος να περιέχεται στο ώριμο ωάριο και το δεύτερο πολικό σωμάτιο να περιλαμβάνει σχεδόν μόνο έναν απλοειδή πυρήνα. Έτσι η ωογένεση καταλήγει σε διατήρηση του όγκου του ωοκυτταρικού κυτοπλάσματος σε ένα απλοειδές κύτταρο κι όχι στην ισομερή διάσπαση του σε τέσσερα κύτταρα (Ncbi, 2000).

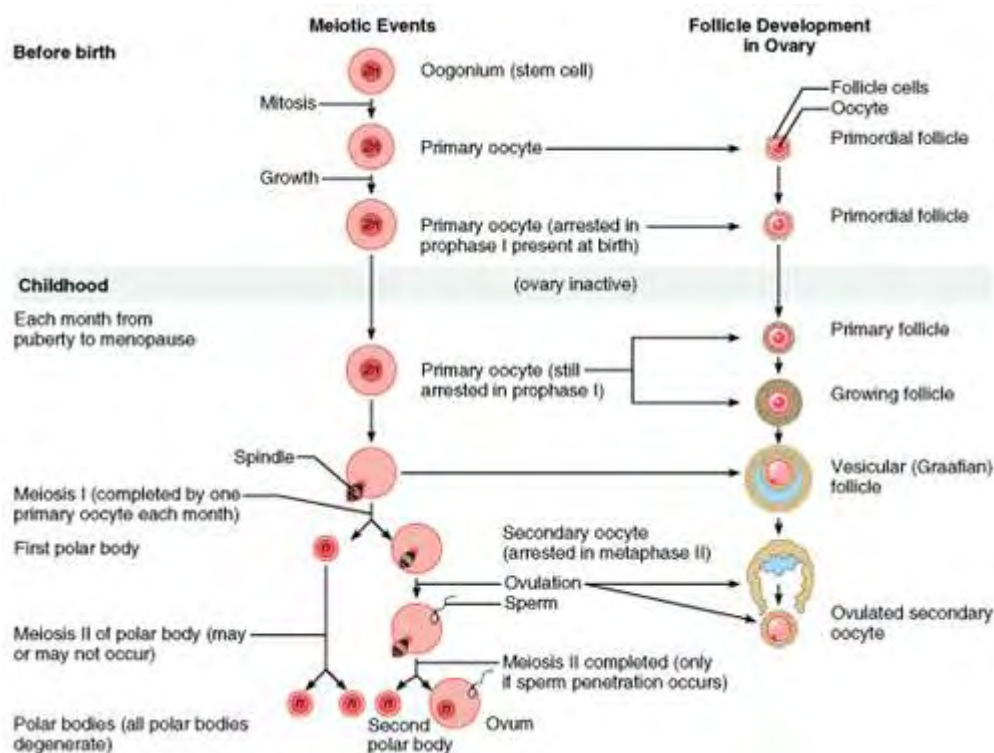
Στα περισσότερα ζώα, η ανάπτυξη των ωαρίων περιλαμβάνει δυο σημεία όπου σταματά η μειωτική διαδικασία, επιτρέποντας έτσι την αύξηση, τη διαφοροποίηση, και τον συντονισμό μεταξύ της γονιμοποίησης και της ολοκλήρωσης της μείωσης. Η διαφοροποίηση του ωαρίου συμβαίνει κατά τη διάρκεια μιας παρατεταμένης χρονικά παύσης στην πρόφαση I, το πρώτο σημείο που σταματά η μείωση. Η ωρίμανση απελευθερώνει τα ωάρια επιτρέποντας να συνεχιστούν οι μειωτικές διαιρέσεις. Το δεύτερο σημείο όπου σταματά η ανάπτυξη συντονίζει την ολοκλήρωση της μείωσης μέσω της

γονιμοποίησης και ποικίλλει μεταξύ των ζώων. Στα περισσότερα σπονδυλωτά το σημείο εκείνο βρίσκεται στη μειωτική διαίρεση II, στα έντομα στη μετάφαση της μείωσης I, στα θαλάσσια ασπόνδυλα στη φάση G1 ενώ στο *C.elegans* η σηματοδότηση από το σπέρμα πυροδοτεί την ωρίμανση των ωαρίων χωρίς να υπάρχει δεύτερο σημείο που σταματά η μείωση (Nishiyama and Kishimoto, 2010).

Τα ωάρια των θηλαστικών όπως και των άλλων σπονδυλωτών ξεκινούν τη μειωτική διαίρεση και στη συνέχεια αυτή σταματά στην πρόφαση, μέχρι η ωχρινοτρόπος ορμόνη (LH) της υπόφυσης να προκαλέσει επανέναρξη της μειωτικής διαίρεσης. Η παύση αυτή στο στάδιο της διπλοταινίας της πρόφασης ξεκινάει κατά την εμβρυική ανάπτυξη και διαρκεί ως την εφηβεία, δηλαδή για μήνες στα ποντίκια και για χρόνια στον άνθρωπο (Hunt and Hassold, 2008). Περιοδικά, ένα ή περισσότερα ωάρια και τα σωματικά κύτταρα των θυλακίων που τα περιβάλλουν, ολοκληρώνουν την ανάπτυξή τους και συνθέτουν πρωτεΐνες απαραίτητες για την επανέναρξη της μείωσης (Erpigg et al., 2004). Ως απάντηση στο σήμα της LH το ωοκύτταρο προχωράει στη δεύτερη μετάφαση όπου και παραμένει μέχρι τη στιγμή της γονιμοποίησης η οποία και οδηγεί στην ολοκλήρωση της μείωσης. Η μετάβαση από την πρόφαση στη μετάφαση χαρακτηρίζεται από την κατάτμηση του πυρηνικού φακέλου γνωστή ως germinal vesicle breakdown (GVBD). Η έναρξη του GVBD εξαρτάται από την ενεργοποίηση της κυκλινοεξαρτώμενης κινάσης 1 (CDK1) (Schuh and Ellenberg, 2007).

Η κατάτμηση του βλαστικού κυστιδίου (GVBD) έχει ξεκινήσει είτε από το προ της ωοθυλακιορρηξίας κύμα γοναδοτροφινών (LH) ή την εκφύλιση λόγω ατρησίας του ωοθυλακίου *in vivo*. Πολλοί παράγοντες διαμεσολαβούν στον έλεγχο του GVBD από τα κοκκώδη κύτταρα. Υψηλά επίπεδα κυκλικής αδενικής μονοφωσφατάσης (cAMP) και της πουρίνης υποξανθίνης στο καλλιεργητικό μέσο παρεμποδίζουν το GVBD. Τα ωάρια συνδέονται με τα κοκκώδη κύτταρα μέσω χασματοσυνδέσμων γεγονός που δείχνει ότι το GVBD ελέγχεται από τα κύτταρα της θήκης. Οι χασματοσύνδεσμοι επιτρέπουν σε ρυθμιστικά μόρια όπως στεροειδή, Ca^{2+} , τριφωσφορική ινοσιτόλη (IP3), cAMP και πουρίνες να κυκλοφορούν ελεύθερα ανάμεσα στο κυταρρόπλασμα

του ωαρίου και τα κοκκώδη κύτταρα. Η προσθήκη ωχρινοτρόπου ορμόνης στο καλλιεργητικό μέσο επάγει το GVBD, προφανώς με κάποιον έμμεσο τρόπο μέσω της επίδρασης της στα κοκκώδη κύτταρα μια και το ωοκύτταρο δε διαθέτει υποδοχείς LH (Dekel, 1988).



Εικόνα 1: Στάδια ωογένεσης – ωοθυλακιογένεσης (www.tarleton.edu)

1.2. Ωρίμανση ωαρίων – Παράγοντες που συμμετέχουν

Ο μηχανισμός της ωρίμανσης ωοκυττάρων τόσο in vivo όσο και in vitro είναι πολύ καλύτερα μελετημένος στα ζώα σε σύγκριση με τον άνθρωπο. Μελέτες σε βοοειδή έδειξαν ότι τα ωάρια από ωοθυλάκια μεταγενέστερων σταδίων έχουν υψηλότερα επίπεδα μιτοχονδριακού RNA σε σύγκριση με εκείνα πιο πρώιμων σταδίων, γεγονός που σχετίζεται με καλύτερη εμβρυική ανάπτυξη (Loneragan et al., 2003; Humblot et al., 2005). Τα μητρικά αντιγόνα, η DNA μεθυλοτρανσφεράση 1 (Dnmt1) και ο παράγοντας TCL1 είναι μερικοί από τους προερχόμενους από το ωοκύτταρο παράγοντες με σημαντικό ρόλο στην εμβρυική ανάπτυξη, την ενεργοποίηση και την συμπίεση (Matzuk et al., 2002; Albertini et al., 2003). Φαίνεται ότι η αστάθεια του mRNA και η έλλειψη ή η

αφθονία ορισμένων μεταγράφων όπως των υποδοχέων της LH και της FSH, η κονεξίνη 43 και η κυκλοξυγενάση-2 στα κοκκώδη κύτταρα μικρών ωοθυλακίων είναι δείκτες ποιότητας των ωαρίων μετά την *in vitro* ωρίμανση (Zheng et al., 2005; Calder et al., 2003; Calder et al., 2005). Επιπλέον σε τρωκτικά έχει περιγραφεί ο σημαντικός ρόλος του GDF-9 και του BMP-15 στην φυσιολογική επανέναρξη της μείωσης (Matzuk et al., 2002). Η έκφραση των mRNA των εν λόγω δεικτών σε ωάρια πριν και μετά την IVM δίνουν μπορούν να αποδειχθεί σημαντικός «πληροφοριοδότης» για τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας που χρειάζονται ώστε να έχουμε καλύτερης ποιότητας ωάρια μετά από *in vitro* ωρίμανση.

Κύριος στόχος της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής είναι το να ληφθεί μεγάλος αριθμός ωοκυττάρων. Στη κλασική IVF αυτό γίνεται με τη χρήση γοναδοτροπινών ώστε να αναπτυχθούν παραπάνω από ένα ωοθυλάκια. Στην IVM, η στρατηγική που χρησιμοποιείται είναι να ληφθούν ανώριμα ωοκύτταρα πριν αυτά επηρεαστούν από την ενδοκρινή και την παρακρινή δράση των ορμονών του κυρίαρχου ωοθυλακίου, ιδανικά κατά τη χρονική φάση που γίνεται η επιλογή του κυρίαρχου ωοθυλακίου (Baker and Spears, 1999, Anderiesz and Trouson, 1995). Μελέτες σε ζωικά μοντέλα έχουν δείξει ότι τα υποδεέστερα ωοκύτταρα που στερούνται FSH είτε λόγω έκθεσης (24-48 ωρών) στο φαινόμενο του κυρίαρχου ωοθυλακίου είτε λόγω παύσης της εξωγενούς FSH (coasting), υποβάλλονται σε μορφολογικές αλλαγές όμοιες με εκείνες που παρατηρούνται μετά το κύμα της LH. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ψευδοωρίμανση επειδή προκαλείται μεταμόρφωση των κοκκωδών κυττάρων σε βλεννογόνο και ενεργοποίηση της επανέναρξης της μειωτικής διαδικασίας σε πρωτογενή ωοκύτταρα εντός μικρών ωοθυλακίων τα οποία υποβάλλονται σε ατρησία (Assey et al., 1994).

Το ωοκύτταρο αποκτά την ικανότητα να επιτύχει πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης αύξησής του. Το ανθρώπινο ωοκύτταρο φτάνει την ωριμότητα σε μέγεθος 100-120 μm στο στάδιο δηλαδή του άντρου όπου το ωοθυλάκιο απέχει ελάχιστα από την ωοθυλακιορρηκτική διάμετρό του (Motlik et al., 1986). Η ικανότητα επανέναρξης της μείωσης φαίνεται ότι αποκτάται όταν το μέγεθος του

ωοθυλακίου είναι μόλις το 10% του τελικού (περίπου 2 μm) (Gilchrist et al., 1995). Στην πράξη, για να παραχθεί ένα ικανό για γονιμοποίηση ωάριο θα πρέπει η ελάχιστη ωοθυλακική διάμετρος να είναι 5 μm (Wynne et al., 1998). Στον άνθρωπο επίσης είναι γνωστό η σημαντικότητα, του εσωοθυλακικού οξυγόνου καθώς και της αγγείωσης του θυλακίου στην κατάλληλη ωοκυτταρική ωρίμανση και στη μετέπειτα εμβρυική ανάπτυξη (Van Blerkom, 2000).

1.3. In vitro maturation

Η in vitro ωρίμανση (IVM) ανθρώπινων ωοκυττάρων χρησιμοποιείται για να βοηθήσει υπογόνιμα ζευγάρια στην τεκνοποίηση και είναι μια πολλά υποσχόμενη νέα τεχνολογία. Αν και σχετικά νέα στο πεδίο της θεραπείας της ανθρώπινης υπογονιμότητας, έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε ζωικούς οργανισμούς και στον κτηνοτροφικό τομέα (Blondin et al., 2002). Αν και τα πρώτα δεδομένα της χρήσης IVM σε ανθρώπους είχαν περιορισμένη επιτυχία (Trounson et al., 1994; Jaroudi et al., 1997; Cha and Chian, 1998;), πιο πρόσφατες μελέτες δίνουν αποτελέσματα συγκρίσιμα με εκείνα της συνηθισμένης εξωσωματικής γονιμοποίησης (Chian et al., 2004; Le Du et al., 2005; Mickelsen, 2005; Soldenstrom-Antilla et al., 2005).

Η in vitro ωρίμανση έχει τη δυνατότητα να αντικαταστήσει ή έστω να υποκαταστήσει την γνωστή μέθοδο της IVF για πολλούς λόγους. Αρχικά δε χρειάζεται χορήγηση τόσο μεγάλων ποσοτήτων γοναδοτροπινών όπως αυτές που χρησιμοποιούνται στα συνήθη πρωτόκολλα ωοθηκικής διέγερσης. Εκτός από το μειωμένο κόστος, με τον τρόπο αυτό εξαλείφεται και το ρίσκο για σύνδρομο υπερδιέγερσης των ωοθηκών καθώς και ο κίνδυνος για μακροχρόνιες παράπλευρες δυσμενείς επιδράσεις των ορμονικών σκευασμάτων (π.χ. καρκίνος του μαστού ή του ενδομητρίου). Η τεχνική αυτή είναι μια πιο φιλική στον ασθενή τεχνική της υποβοηθούμενης αναπαραγωγής και θεωρητικά μπορεί να εφαρμοστεί σε όλο τον υπογόνιμο πληθυσμό, αν και αποτελεί χρήσιμο εργαλείο ειδικά στις περιπτώσεις γυναικών με σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών PCOS, γυναικών (πχ μετά από αφαίρεση σαλπίγγων) και ζευγαριών που δεν έχουν πρόβλημα γυναικείας

υπογονιμότητας μια και αυτές οι κατηγορίες παρουσιάζουν μικρότερη ανοχή στην υπερδιέγερση των ωοθηκών (Jurema et al., 2006)

Το 1935, οι Pincus και Enzmann (Pincus and Enzman, 1935) ανέφεραν ότι ανώριμα ωάρια κουνελιών είχαν την ικανότητα αυτόματης *in vitro* ωρίμανσης και στη συνέχεια γονιμοποίησης. Παρόμοιες περιπτώσεις παρατηρηθήκαν αργότερα και στον άνθρωπο από τον Edwards (Edwards, 1965). Έτσι ανώριμα ωάρια που είχαν ανακτηθεί από αναπτυσσόμενα ωοθυλάκια μετά από χορήγηση γοναδοτροπινών αφέθηκαν ώστε να ωριμάσουν αυτόματα στο εργαστήριο. Αποδείχτηκε έτσι ότι αυτά τα ωοκύτταρα είχαν όχι μόνο την ικανότητα να ωριμάσουν και να γονιμοποιηθούν αλλά και να οδηγήσουν στην παραγωγή ζώντων νεογνών (Veeck et al., 1983).

Η *in vitro* ωρίμανση απαιτεί την ωρίμανση των ωαρίων στο εργαστήριο για 24 ώρες πριν την γονιμοποίηση. Ακόμα δεν είναι απόλυτα γνωστό τι πρέπει να περιέχει ένα κατάλληλο θρεπτικό μέσο για IVM, αν και έχουν περιγραφεί στη βιβλιογραφία, αν και υπάρχουν λίγες μελέτες σύγκρισης διαφόρων μεσών στη επιτυχία της ωρίμανσης (Trounson et al., 2001).

Η συχνότερη τεχνική *in vitro* ωρίμανσης δε χρησιμοποιεί ωάρια από πρωτόκολλα πολλαπλής ωοθυλακικής ωρίμανσης, που απέτυχαν να ωριμάσουν αλλά σκοπίμως ανώριμα ωάρια από μη διεγερμένες ή ελάχιστα διεγερμένες ωοθήκες και καλλιέργειά τους μαζί με τα κοκκώδη κύτταρα που τα περικλείουν (Cha et al., 1991).

1.3.1 “Rescue” ωρίμανση ανώριμων ωαρίων *in vitro*

Η *in vitro* ωρίμανση μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιπρόσθετα σε κύκλους IVF με διέγερση ωοθηκών. Στις περιπτώσεις αυτές, παρά τη χορήγηση γοναδοτροπινών, ένα ποσοστό ωαρίων δεν ωριμάζει με αποτέλεσμα κατά την ανάκτηση τους να βρίσκονται στη φάση GV. Αυτά καλλιεργούνται στο εργαστήριο ώστε να ωριμάσουν, μια διαδικασία που είναι γνωστή ως IVM «διάσωσης» (rescue IVM) και αποτελεί μια τεχνική μέσω της οποίας έχουν

αναφερθεί επίτευξη εγκυμοσύνης και γέννηση ζώντων νεογνών (Liu et al., 2003).

Είναι σημαντικό να επισημανθεί όμως το γεγονός ότι κάποια ανώριμα ωκύτταρα μετά από ωληψίες προχωρούνε αυτόματα στη μετάφαση II αυτό δε σημαίνει ότι πληρούν τις προϋποθέσεις να επιτύχουν την ανάπτυξη εμβρύου. Η επαρκής ωκυτταρική ανάπτυξη απαιτεί συγχρονισμό στην πυρηνική και κυτταροπλασματική ωρίμανση, η οποία και πρέπει να επιτευχθεί στα ανώριμα ωάρια με έκθεσή τους στα κατάλληλα σήματα (Moor et al., 1998). Τα ανώριμα ωάρια που είναι απογυμνωμένα από τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν –για λόγους ελέγχου της ωριμότητάς τους- φαίνεται πως έχουν μικρό δυναμικό γονιμοποίησης και παράγουν έμβρυα με προβλήματα διαίρεσης (De Vos et al., 1999; Kim et al., 2000). Η μη βέλτιστη ανάπτυξη αυτών των εμβρύων οφείλεται στο γεγονός ότι τα συγκεκριμένα ωάρια είναι κακής ποιότητας, κάτι το οποίο εξηγεί και την αδυναμία τους να ωριμάσουν in vitro παρά την έκθεσή τους σε υψηλά επίπεδα γοναδοτροπινών. Το μεγάλο ποσοστό ανευπλοειδιών που παρατηρείται σε τέτοια έμβρυα εξηγείται από αυτό το γεγονός (Emery et al., 2005).

1.3.2. Κατηγορίες ασθενών στους οποίους εφαρμόζεται η in vitro ωρίμανση

Πολλές δημοσιεύσεις έχουν περιγράψει τη χρήση του IVM σε γυναίκες με PCO (Child et al., 2001; Cha et al., 2000). Οι μελέτες αυτές συμπεριλαμβάνουν γυναίκες με μη φυσιολογικούς έμμηνους κύκλους προκαλούμενους από το σύνδρομο πολυκυστικών ωοθηκών (PCOS) και γυναίκες με φυσιολογικούς κύκλους αλλά πολυωθυλακικές ωοθήκες στη βάση της υπερηχογραφικής απεικόνισης (PCO). Οι προφανείς λόγοι της επιλογής γυναικών με PCO και PCOS για την εφαρμογή της τεχνολογίας IVM είναι ο μεγαλύτερος αριθμός διαθέσιμων ωοθυλακίων με άντρο σε κάθε ωοθήκη. Επειδή οι γυναίκες με PCO ή PCOS είναι πιθανότερο να υποστούν OHSS, είναι επίσης πιο πιθανό οι γυναίκες αυτές να ωφεληθούν από την IVM.

Η in vitro ωρίμανση έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε γυναίκες με φυσιολογικούς έμμηνους κύκλους και φυσιολογικές φαινομενικά ωοθήκες. Ο λόγος για τη χρήση της IVM σε αυτή την ομάδα ασθενών είναι η προσπάθεια για μια πιο οικονομική και λιγότερο απαιτητική θεραπεία υπογονιμότητας συγκριτικά με την COH-IVF. Για τους ίδιους λόγους είναι επίσης λογικό να αποφεύγεται η θεραπεία με γοναδοτροπίνες σε γυναίκες στις οποίες η υπογονιμότητα οφείλεται αποκλειστικά σε ανδρικό παράγοντα ή σε αρχικά γόνιμες γυναίκες οι οποίες μετά από απολίνωση των σαλπίγγων επιθυμούν να συλλάβουν ξανά. Η in vitro ωρίμανση ωαρίων έχει εφαρμοσθεί, αν και σε μικρότερο βαθμό, και σε άλλες ομάδες ασθενών, όπως σε άτομα με μικρή ανταπόκριση στην COH-IVF (Liu et al., 2003).

1.3.3. Καλλιεργητικά μέσα για in vitro ωρίμανση

Τα τρέχοντα πρωτόκολλα in vitro ωρίμανσης είναι σε γενικό βαθμό αναποτελεσματικά στο να παράγουν βιώσιμα έμβρυα λόγω της ανώμαλης κυτταροπλασματικής τους ωρίμανσης (Krisher and Bavister, 1998). Συχνά τα έμβρυα που παράγονται μετά από IVM σταματάνε την ανάπτυξη είτε στο στάδιο των προπυρήνων είτε στο στάδιο των 4 ή 8 κυττάρων και δε φτάνουν σε βλαστοκύστη (Barnes et al. 1996). Τα χαμηλά ποσοστά εγκυμοσύνης μετά από IVM δείχνουν ότι τα ανθρώπινα ωοκύτταρα αποκτούν την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε βλαστοκύστη κατά τα τελικά στάδια της ωοθυλακιογένεσης. (Barnes et al., 1995).

Το ωοθυλάκιο επηρεάζει την ποιότητα του ωαρίου και για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν σε βοοειδή μελέτες σχετικές με το ωοθυλακικό υγρό (bFF) και την επίδρασή του στην ωρίμανση ωαρίων. Η σύνθεση του ωοθυλακικού υγρού αλλάζει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ωοθυλακίων. Μια μελέτη του Sirard και των συνεργατών του απέδειξε ότι η προσθήκη ωοθυλακικού υγρού επηρεάζει το αναπτυξιακό δυναμικό ωοκυττάρων που λαμβάνονται από μη διεγερμένες ωοθήκες (Sirard et al. 1995). Παρατηρείται ακόμα υψηλότερη συγκέντρωση οιστραδιόλης στο ωοθυλακικό υγρό των μεγαλύτερων ωοθυλακίων (Belin et al, 2000). Στα βοοειδή, πριν από το κύμα

της LH, η συγκέντρωση της οιστραδιόλης στο ωοθυλακικό υγρό είναι υψηλή (περίπου 1 g / ml), αλλά μειώνεται απότομα στη συνέχεια (Fortune και Hansel, 1985). Παρά το γεγονός ότι δεν αποδεικνύεται ότι η οιστραδιόλη εμπλέκεται στην επανέναρξη της μειωτικής διαδικασίας, είναι πιθανόν να εμπλέκεται στις κυτταροπλασματικές αλλαγές που συμβαίνουν πριν από το κύμα της LH. Προσθήκη ωοθυλακικού υγρού στο καλλιεργητικό μέσο της IVM έχει αποδειχθεί ότι παρέχει ένα πιο ευνοϊκό μικροπεριβάλλον για την περαιτέρω ανάπτυξη του ανώριμου ωοκύτταρου. Έχουν παρατηρηθεί υψηλοί ρυθμοί ανάπτυξης μετά από IVM, ειδικά μετά από προσθήκη bFF. (Ali et al., 2004).

Η ευεργετική επίδραση των κοκκωδών κυττάρων του ωοφόρου δίσκου κατά τη διάρκεια της IVM μπορεί να αποδοθεί στο σχηματισμό ενός ευνοϊκού μικροπεριβάλλοντος (βιοχημικές ή μεταβολικό) γύρω από το ωοκύτταρο (Tanghe et al., 2002). τα κοκκώδη κύτταρα συμμετέχουν στην ανάπτυξη των ωοκυττάρων κατά τη διάρκεια της IVM, είτε με έκκριση διαλυτών παραγόντων, που επάγουν την ανάπτυξη ή αφαιρώντας ανασταλτικούς ή τοξικούς παράγοντες από το καλλιεργητικό μέσο (Homa, 1995; Hashimoto et al., 1998). Επιπλέον, τα κύτταρα του ωοφόρου δίσκου πιθανόν να επιδρούν στην μετέπειτα ανάπτυξη των ωοκυττάρων μέσω ενδοκυτταρικών αλλαγών στα ιόντα ασβεστίου ή αλλαγών στο pH (Mori et al., 2000). Μια άλλη πιθανή επίδραση των κοκκωδών κυττάρων κατά τη διάρκεια της IVM σε ωάρια βοοειδών φαίνεται να είναι η μείωση της έντασης του οξυγόνου στο περιωοκυτταρικό χώρο ως αποτέλεσμα του μεταβολισμού τους (Ali et al., 2003). Έχει αποδειχθεί ότι η παρουσία των κοκκωδών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης είναι απαραίτητη για την επαρκή τους ωρίμανση, μελετώντας ωάρια από τα οποία έχουν απομακρυνθεί τα κύτταρα αυτά. Μελέτη έδειξε ότι η ωρίμανση των ωαρίων και η ανάπτυξη στο στάδιο 2-8 κυττάρων 72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση δεν επηρεάστηκε από την απουσία των κοκκωδών κυττάρων κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Ωστόσο, η ανάπτυξη πέρα από το στάδιο της βλαστοκύστης ήταν σημαντικά χαμηλότερη στα καθαρισμένα από τα κοκκώδη ωοκύτταρα σε σχέση με εκείνα που τοποθετηθήκανε για *in vitro* ωρίμανση χωρίς καθαρισμό, υποδεικνύοντας τη σημασία τους κατά τη διάρκεια IVM ωαρίων στην κυτταροπλασματική ωρίμανση και την επακόλουθη πρόωμη ανάπτυξη (Ali et al., 2005).

Στις περισσότερες αναφορές, η IVM ωαρίων θηλαστικών πραγματοποιείται σε ατελώς καθορισμένα συστήματα καλλιέργειας που περιέχουν σωματικά κύτταρα, ορό αίματος, αλβουμίνη βόειου ορού (BSA) ή κύτταρο-ρυθμισμένο μέσο. Πέραν του ότι είναι μια δυνητική πηγή μολυσματικών παραγόντων, αυτά τα συστατικά καθιστούν δύσκολο να υπάρξει κατάλληλος ποιοτικός έλεγχος και αξιολόγηση των βασικών απαιτήσεων σε μεταβολικά υποστρώματα, θρεπτικά συστατικά, αναπτυξιακούς παράγοντες και ορμόνες κατά την IVM.

Στα περισσότερα ωάρια των θηλαστικών, η συμπλήρωση των *in-vitro* καλλιεργητικών μέσων γίνεται με γοναδοτροπίνες, στεροειδή, αυξητικούς παράγοντες ξεχωριστά ή σε συνδυασμό. Προσθήκη ανασυνδυασμένης ανθρώπινης FSH (rFSH) και 17-οιστραδιόλης κατά τη διάρκεια της IVM ωαρίων βοοειδών οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των εμβρύων που παρήχθησαν μετά από IVF.(Ali και Sirard, 2002b). Διάφορα καλλιεργητικά μέσα για IVM ανθρώπινων ωαρίων περιέχουν οιστραδιόλη για την υποστήριξη της κυτταροπλασματικής ωρίμανσης, μετά την έρευνα που δείχνει ότι ωάρια που ωρίμασαν παρουσία υψηλότερων επιπέδων οιστραδιόλης (1000 ng / ml) φέρουν βελτιωμένο αναπτυξιακό ρυθμό σε βλαστοκύστη (Ali και Sirard, 2002b).

Άλλες παρατηρήσεις σε ζώα υποδεικνύουν την πιθανότητα η προσθήκη υαλουρονικού οξέος (HA) με οιστραδιόλη σε μέσα καλλιέργειας να αυξάνει την αποτελεσματικότητα στην *in-vitro* ωρίμανση ωαρίων (Ali et al., 2002). Η επίδραση της LH κατά τη διάρκεια της IVM για ωρίμανση ωοκυττάρων έχει επίσης αμφισβητηθεί. Αρχικά, υπήρξαν πολλές μελέτες που ανέφεραν τις ευεργετικές επιδράσεις της LH (Choi et al., 2001). Ωστόσο, πρόσφατα ευρήματα έχουν δείξει ότι η LH δεν έχει καμία επίδραση στο αναπτυξιακό δυναμικό των ωαρίων βοοειδών όταν προστίθεται σε καλλιέργειες (Ali and Sirard, 2002b). Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν προηγούμενα ευρήματα από τους Izadyar και τους συνεργάτες του (1996), οι οποίοι ανέφεραν ότι σε ωοκύτταρα βοοειδών που καλλιεργήθηκαν υπό την παρουσία FSH και ανθρώπινης χοριακής γοναδοτροπίνης (hCG), μόνο η FSH, και όχι η LH επηρέασε την ωρίμανση τους. Το γεγονός αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί από το ότι η επίδραση της LH στο ωάριο δεν είναι άμεση. Στην

πραγματικότητα, τα COC που χρησιμοποιούνται για τις μελέτες IVM προέρχονται από μικρά και μεσαίου μεγέθους ωοθυλάκια (2-6 mm), και έχει αποδειχθεί ότι οι υποδοχείς της FSH αλλά όχι της LH έχουν ήδη κάνει την εμφάνιση τους στα κοκκώδη κύτταρα αυτών των ωοθυλακίων (Van Tol et al., 1996). Μια άλλη ορμόνη της υπόφυσης που έχει προταθεί ως βοηθητική στην υποβοηθούμενη αναπαραγωγή είναι αυξητική ορμόνη (GH). Ο ρόλος της GH στη λειτουργία των ωοθηκών, την ανάπτυξη των ωοθυλακίων και την στεροειδογένεση είναι γνωστός και φαίνεται θετική επίδραση της GH στην ωρίμανση των ωοκυττάρων. Η ποσότητα της GH σε FF έχει δείχθει να σχετίζεται θετικά τόσο με τη φυσιολογική γονιμοποίηση όσο και με την προεμφυτευτική μορφολογία των εμβρύων (Mendoza et al., 1999). Επιπλέον, η GH είναι γνωστό ότι ενισχύει τα εντός ωοθυλακίου μεταβολικά γεγονότα που απαιτούνται για την ωρίμανση των ωοκυττάρων. Μια μελέτη από τον Mendoza και τους συνεργάτες του (2002) επίσης ανέφερε ότι η συγκέντρωση της GH συγκέντρωση στο FF είναι σημαντικά υψηλότερη στους κύκλους εκείνους της IVF όπου προκύπτει εγκυμοσύνη από ότι σε αυτούς που δεν προκύπτει. Η προσθήκη της GH κατά τη διάρκεια της IVM έχει δείχθει να επιταχύνει την πυρηνική ωρίμανση και να προωθεί την εμβρυϊκή ανάπτυξη (Iga et al., 1998).

Ορός - IVM και γονιμοποίηση

Ο ορός εμβρύου βοοειδούς (FCS) έχει αναγνωριστεί ως ένα σημαντικό συστατικό για την in-vitro ωρίμανση ωαρίων. Είναι γνωστό ότι ο FCS είναι απαραίτητος για την από την FSH προκαλούμενη διεύρυνση των κοκκωδών κυττάρων σε χάμστερ και βοοειδή (Leibfried- Rutledge et al., 1986). καθώς και ότι τα ωάρια βοοειδών που έχουν ωριμάσει παρουσία FCS έχουν υψηλότερα ποσοστά εισόδου σπερματοζωαρίων. Ο FCS περιέχει μια πρωτεΐνη που ονομάζεται φετουΐνη και αναστέλλει τη σκλήρυνση της διαφανούς ζώνης που προκύπτει από τη φλοιώδη αντίδραση (Schroeder et al., 1990).

Ορός και ανάπτυξη ωοκυττάρων

Η συμπλήρωση του μέσου καλλιέργειας με πρωτεΐνη κατά τη διάρκεια της IVM μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας. Η in vitro ωρίμανση σε ωάρια ανθρώπου και βοοειδών έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την

περιεκτικότητα τους σε πρωτεΐνης σε σχέση με την *in vivo*. (Trounson et al., 2001), υποδηλώνοντας ότι οι πρωτεΐνες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη διαδικασία ανάπτυξης. Ο FCS και ο μητρικός ορός έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί ως συμπληρώματα πρωτεΐνης στην εξωσωματική γονιμοποίηση. Μολονότι τα ωκυττάρια μπορούν να καλλιεργηθούν χωρίς πρωτεϊνικά ή ορμονικά συμπληρώματα (Ali και Sirard, 2002a, b), η παραγωγή εμβρύων φαίνεται να βελτιώνεται όταν αυτά περιλαμβάνονται στο μέσο καλλιέργειας. Σύμφωνα με μελέτη, προτείνεται ότι η επίδραση του FCS ως πρωτεΐνη συμπληρώματος στη διάρκεια IVM ωκυττάρων βοοειδών εξαρτάται από το είδος του καλλιεργητικού μέσου που χρησιμοποιείται. Οι ίδιοι συγγραφείς έδειξαν ότι όταν ο FCS αντικαθίσταται από την BSA ως τη μόνη πηγή πρωτεΐνης κατά τη διάρκεια της IVM ωκυττάρων, η BSA όχι μόνο καθυστερεί την πυρηνική ωρίμανση, αλλά μειώνει και την αναπτυξιακή ικανότητα των ωαρίων. Αυτά τα ωάρια απέδωσαν το χαμηλότερο ποσοστό ανάπτυξης σε βλαστοκύστης σε σύγκριση με εκείνα που ωρίμασαν σε μέσο χωρίς συμπλήρωμα BSA (Ali and Sirard, 2002b).

Επίδραση των αντιοξειδωτικών στην ανάπτυξη ωαρίων

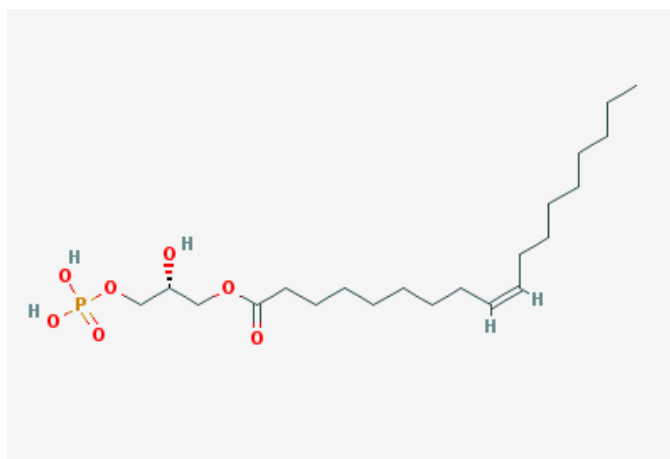
Τα αντιοξειδωτικά μπορεί να είναι ευεργετικά ως προσθετικά σε συνθετικά καλλιεργητικά μέσα. Σε κάποια καλλιεργητικά μέσα, υπάρχει έλλειψη ορού ή άλλων μακρομορίων που χρησιμεύουν ως "καθαριστές" ελεύθερων ριζών οξυγόνου (ROS). Είναι γνωστό ότι η συγκέντρωση του οξυγόνου εντός του αυλού του γυναικείου αναπαραγωγικού συστήματος είναι περίπου το 1/3 (3-9%) εκείνου που βρέθηκε κάτω από πρότυπες *in-vitro* συνθήκες (Mastroianni, 1965). Καλλιέργεια εμβρύων σε υψηλά επίπεδα οξυγόνου *in vitro* (20%) μπορεί να παράγει περισσότερες ελεύθερες ρίζες (Fowler και Callingham, 1995) από ότι η καλλιέργεια εμβρύων σε συνθήκες 5% ή 7% O₂ (Liu και Foote, 1995). Αρνητικές επιπτώσεις της προερχόμενων από οξυγόνο ελεύθερων ριζών κατά τη διάρκεια της *in-vitro* καλλιέργειας υπήρξαν αποδειχθεί σε διάφορα είδη. Οι ROS μπορεί να προκαλέσουν μιτοχονδριακή δυσλειτουργία, βλάβες στο DNA, το RNA και τις πρωτεΐνες (Comporti, 1989) καθώς επίσης και αναστολή της σύντηξης σπερματοζωαρίου-ωαρίου (Aitken, 1993). Για να προστασία των ωαρίων και των εμβρύων από το οξειδωτικό

στρες κατά τη διάρκεια της in-vitro καλλιέργειας διάφορα αντιοξειδωτικά μπορούν να προστεθούν στο καλλιεργητικό μέσο (Ali et al., 2003).

1.4. Λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA)

Τα λυσοφωσfolιπίδια (LPs) είναι είδη λιπιδίων γνωστά ως συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών, με πιο γνωστά το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) και τη σφιγγοσίνη 1- φωσφατάση (S1P). Και τα δύο βρίσκονται σε άφθονη ποσότητα στο αίμα (0,2-5 μM) και τους ιστούς (0,2-100 nmol/g) και παράγονται από ενεργά αιμοπετάλια κι άλλα κύτταρα, όπως τα ερυθροκύτταρα. Τα λυσοφωσfolιπίδια έχουν απλή χημική δομή: μια 3-ανθρακική γλυκερόλη ή ένας σφιγγοειδής σκελετός με μια ακυλοαλυσίδα που ποικίλλει σε μήκος και τον κορεσμό (Ishii et al., 2004).

Το λυσοφωσφατιδικό οξύ (1-ακυλ-2-υδροξυ-sn-γλυκερο-3-φωσφορικό, LPA), που κάποτε θεωρούνταν μόνο ενδιάμεσο στη βιοσύνθεση των φωσfolιπιδίων, έχει βρεθεί ότι αποτελεί έναν βιολογικά πολυλειτουργικό μεσολαβητή. Ανήκει στην οικογένεια των φωσfolιπιδικών αυξητικών παραγόντων και δρα τόσο ως μιτογόνο όσο και ως αντιμιτογόνο στο κυτταρικό κύκλο, καθώς επίσης σημαντικός είναι ο ρόλος τους στη ρύθμιση της ακτίνης του κυτταροσκελετού, την κυτοκίνηση, την διείσδυση καρκινικών κυττάρων και την κινητικότητα του ενδοκυτταρικού ασβεστίου. Λόγω αυτών των δράσεων του το LPA θεωρείται ρυθμιστής της κυτταρικής ομοιόστασης, της επούλωσης τραυμάτων και της καρκινογένεσης (Skoura and Hla, 2009).



Εικόνα 2: Δομή του λυσοφωσφατιδικού οξέος (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

1.4.1. Το LPA και οι υποδοχείς του

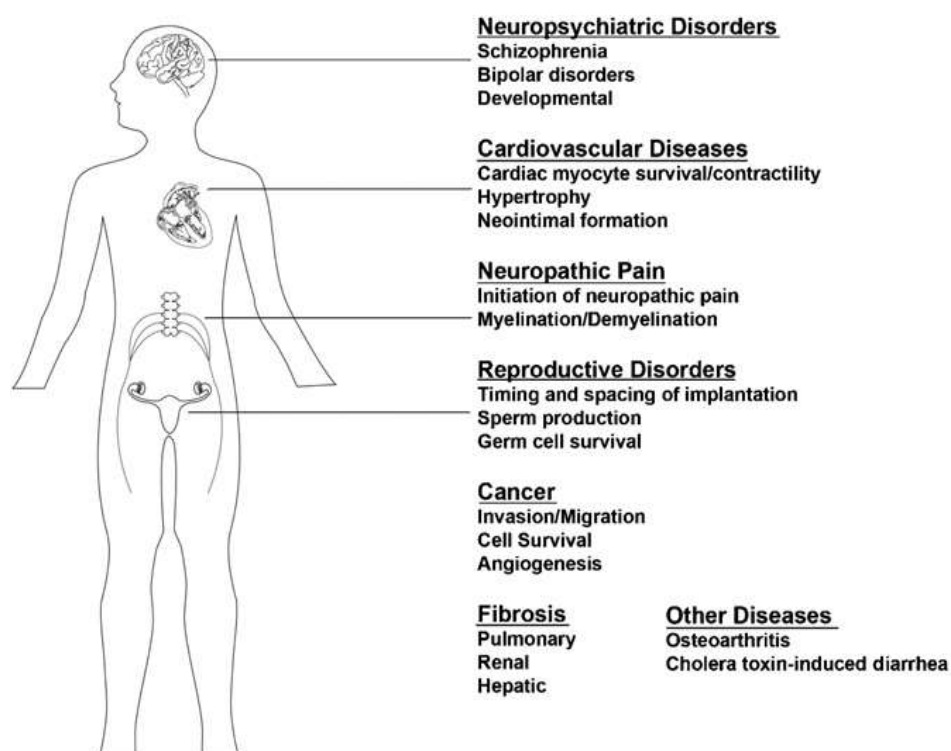
Εκτός από το ρόλο τους σαν ενδιάμεσα του μεταβολισμού τα λιπίδια αυτά λειτουργούν και ως εξωκυτάρια σήματα μέσω της σύνδεσής τους με υποδοχείς G πρωτεϊνών. Πιο συγκριμένα για το LPA έχουν ήδη χαρακτηριστεί 5 υποδοχείς γνωστοί ως LPA1-5. Ο κύριος μοριακός μηχανισμός σηματοδότησης βρέθηκε 1996 με την κλωνοποίηση του πρώτου υποδοχέα για το LPA. Ο υποδοχέας, που ονομάζεται LPA1, είναι ένας GPCR που συνδέεται σε ετεροτριμερή G πρωτεΐνες (Gi, Gq, G12 / 13 άλφα υπομονάδες) και μπορεί να προκαλέσει πολλαπλές κυτταρικές αποκρίσεις κατά τη διέγερση με LPA (Hechth et al., 1996; Fukushima et al., 2001; Ishii et al., 2004). Βάσει ομοιότητας στην ακολουθία, δύο άλλοι υποδοχείς LPA εντοπίστηκαν: οι LPA2 και LPA3 (An et al., 1998; Bandoh et al., 1999). Πιο πρόσφατα, δύο ακόμα GPCRs έχουν δείξει να ανταποκρίνονται στο LPA, οι LPA4 / P2Y9 / GPR23 και LPA5 / GPR92 (Noguchi et al., 2003; Lee et al., 2006). Ο LPA4 είναι πιο στενά συνδεδεμένος με πουρινεργικούς υποδοχείς, ενώ μοιράζεται μόνο 20-24% κοινά αμινοξέα με τον LPA1-3 (Noguchi et al., 2003). Ο LPA5 αντίστοιχα μοιράζεται με τον LPA4 περίπου 35% κοινών αμινοξέων (Choi et al., 2008). Δύο επιπλέον υποδοχείς, ο GPR87 και ο P2Y5, έχουν προταθεί ως νέοι LPA υποδοχείς (Tabata et al., 2007; Pasternack et al., 2008).

1.4.2. Παραγωγή του LPA

Το LPA έχει ανιχνευτεί σε σημαντικές ποσότητες σε βιολογικά υγρά όπως ο ορός (σε μικρομοριακή συγκέντρωση) και το πλάσμα (Baker et al., 2000), το σάλιο (Sugiura et al., 2002), το εξίδρωμα (Mazereeuw-Hautier et al., 2005), το δάκρυ (Liliom et al., 1998), το ασπράδι του αυγού της κότας (Nakane et al., 2001), το ωοθυλακικό υγρό (Tokumura et al., 1999), το σπερματικό πλάσμα (Hama et al., 2002) και ο ασκίτης (Tokumura et al., 2007). Φαίνεται ότι πολλοί τύποι κυττάρων όπως τα αιμοπετάλια (Eichholtz et al., 1993), τα ερυθροκύτταρα (Fourcade et al., 1995), οι μεταμπτωτικοί νευρώνες (Fukushima et al., 2000), τα καρκινικά κύτταρα των ωοθηκών και του τραχήλου της μήτρας (Shen et al., 1998; Luquain et al., 2003), τα λιποκύτταρα

(Gesta et al., 2002) και τα μαστοκύτταρα (Mori et al., 2007) είναι σε θέση να παράγουν LPA.

Μελέτες σχετικές με την παραγωγή LPA στον ορό έχουν προτείνει δύο κύριες οδούς παραγωγής που περιλαμβάνουν τη φωσφολιπάση D (PLD), τη φωσφολιπάση A1 (PLA1), τη φωσφολιπάση A2 (PLA2) και τη αυτοταξίνη / λυσοφωσφολιπάση D (ATX / lysoPLD). Μια από τις κύριες οδούς είναι η διάσπαση των φωσφολιπιδίων (PLs) από την φωσφολιπάση D για το σχηματισμό φωσφατιδικών οξέων (PAs). Το LPA παράγεται από την υδρόλυση των φωσφατιδικών οξέων από τις PLA1 και PLA2 και η διαδικασία αυτή μπορεί να αντιστραφεί από LPA ακυλοτρανσφεράσες (Leung, 2001). Η άλλη κύρια οδός είναι η διάσπαση των LPs όπως το LPC, η λυσοφωσφατιδυλαιθανολαμίνη και λυσοφωσφατιδυλοσερίνη από την ATX / lysoPLD ώστε να ελευθερωθεί LPA. Οι PLA1 και PLA2 εμπλέκονται στην παραγωγή των LPs από μεμβρανικά φωσφολιπίδια σε αυτή την οδό. Το εξωκυτταρικό LPA συνήθως δεσμεύεται σε μόρια, όπως η αλβουμίνη, οι πρωτεΐνες δέσμησης λιπαρών οξέων, η γελσολίνη και λιποπρωτεΐνες για μεταφορά και σταθερότητα (Pages et al., 2001).



Εικόνα 3: Διαταραχές στον ανθρώπινο οργανισμό που οφείλονται στη μη σωστή λειτουργία του LPA (Lin et al., 2010)

1.4.3. Το LPA στο αναπαραγωγικό σύστημα

Ο πιθανός ρόλος της σηματοδότησης μέσω υποδοχέα του LPA στην ωοθήκη προτάθηκε πριν από τον προσδιορισμό των υποδοχέων των LP. Τα τελευταία 15 χρόνια το LPA ανιχνεύθηκε στο ωοθυλακικό υγρό και στο αυγό της κότας, καθώς επίσης σημαντική ήταν η παρουσία τους στο ωοθυλακικό υγρό ανθρώπινων ωοθυλακίων πριν την ωορρηξία (Tokumura et al., 1999). Η διέγερση των ωοθηκών σε γυναίκες φαίνεται να αυξάνει τα επίπεδα του LPA λόγω της υψηλότερης δραστηριότητας ATX / lysoPLD σε ασθενείς που υπόκεινται σε διέγερση των ωοθηκών σε σχέση με το φυσικό κύκλο (Chen et al., 2008). Υψηλές ποσότητες ακυλιωμένου LPA είναι παρούσες στο κρόκο του αυγού της κότας, κυρίως κορεσμένο LPA, και στο ασπράδι του της αυγού κότας, κυρίως πολυακόρεστο LPA, γεγονός που υποδηλώνει ότι τα δυο είδη μπορεί να παίζουν ξεχωριστούς ρόλους στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των εμβρύων (Nakane et al, 2001). Μετάγραφα των LPA1, LPA2 και LPA4, αλλά όχι του LPA3, ανιχνεύονται στην ωοθήκη του ποντικίου (Ye et al., 2005) ενώ σε γυναίκες που υποβάλλονται σε εξωσωματική γονιμοποίηση mRNAs των LPA1, LPA2 και LPA3 ανιχνεύονται στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα (Chen et al., 2008). Το mRNA του LPA4 έχει την υψηλότερη έκφραση στην ανθρώπινη ωοθήκη σε σύγκριση με όλους τους ανθρώπινους ιστούς που εξετάστηκαν (Noguchi et al., 2003).

Ο ρόλος του LPA στα ωχρινοποιημένα κοκκώδη κύτταρα γυναικών που υποβάλλονται σε IVF έχει πρόσφατα αναφερθεί . Το LPA ενισχύει την έκφραση των αγγειογόνων κυτοκινών, ιντερλευκίνη-6 (IL-6) και ιντερλευκίνη-8 (IL-8). Προτάθηκε ότι το LPA σε προ-ωορρηκτικά ωοθυλάκια μπορεί να παίζει ρόλο στην αγγειογένεση του ωχρού σωματίου και η υπέρμετρη επαγωγή της IL-8 και IL-6 από το LPA πολλαπλών ωχρών σωματίων σε διεγερμένες ωοθήκες μπορεί να είναι μια αιτία του συνδρόμου υπερδιέγερσης των ωοθηκών (Chen et al., 2008). Αποτελέσματα σχετικά με τον υποδοχέα LPA2 σε διαγονιδιακές ωοθήκες δείχνουν ότι το κύκλωμα LPA-LPA2 μπορεί να ρυθμίσει τα ωοθηκικά κύτταρα τόσο άμεσα όσο και μέσω της αύξησης των αυξητικών παραγόντων (Huang et al., 2004).

Φαίνεται ακόμα ότι το LPA επιταχύνει τη μεταφορά των εμβρύων μέσω των αγωγών (Kunikata et al., 1999) και προωθεί την ανάπτυξη τους (Kobayashi et al., 1994). Θεωρήθηκε ότι η ενδεχόμενη ύπαρξη LPA στο σαλπιγγικό υγρό συμμετέχει στην ανάπτυξη και τη μεταφορά του εμβρύου στη σάλπιγγα, μετά από πειράματα που απέδειξαν ότι το ασπράδι του αυγού της κότας, που προέρχεται από το σαλπιγγικό της υγρό, περιέχει λυσοφωσφολιπάση D η οποία συμμετέχει στην παραγωγή ακόρεστου LPA (Nakane et al., 2001). έχει ακόμα αποδειχτεί η συμμετοχή του LPA στην εμφύτευση (Shiokawa et al., 2000).

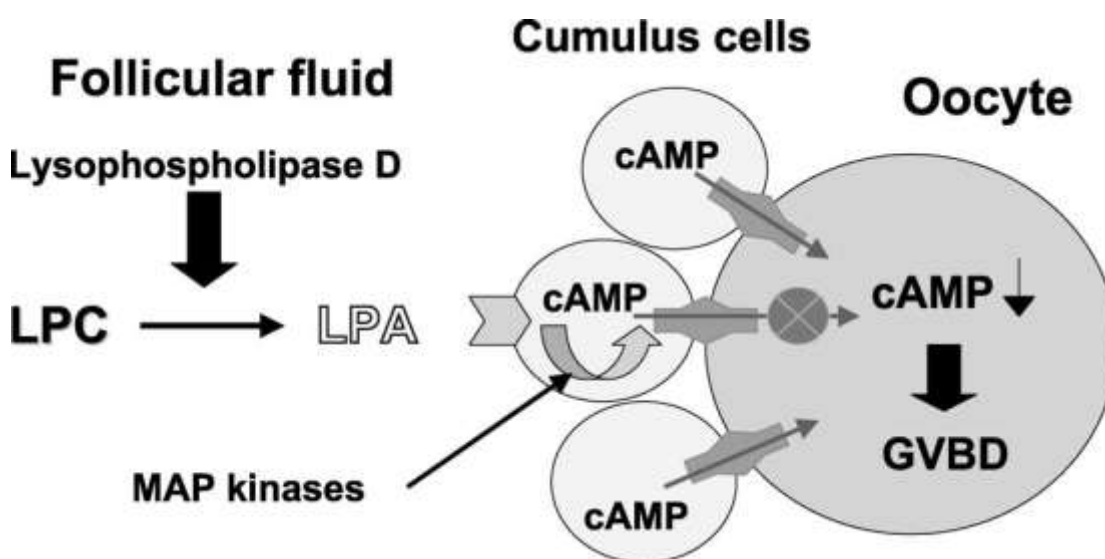
Επιπρόσθετα έχει δείχτεί ότι η αυξημένη δραστηριότητα των ενζύμων που παράγουν LPA στον ορό εγκύων γυναικών σχετίζεται με την αλληλεπίδραση εμβρύου-μητέρας μέσω των κυκλοφορικών τους συστημάτων, η οποία είναι απαραίτητη για την επιτυχή διατήρηση της εγκυμοσύνης (Reynolds and Redmer, 2001).

1.5. Ο ρόλος του LPA στην ωρίμανση ωαρίων in vitro

Το ωοθυλακικό υγρό από ανθρώπινα ωοθυλάκια περιέχει 10-25 μM LPA (Tokumura et al., 1999). Το LPA εμπλέκεται στην ωρίμανση των ωοκυττάρων in vitro, με ποσότητες 10 μM , να αυξάνουν σημαντικά τα ποσοστά πυρηνικής και την κυτταροπλασματικής ωρίμανσης σε ανώριμα ωοκύτταρα χρυσού χάμστερ μέσω των κοκκωδών κυττάρων (Hinokio et al., 2002). Οι υποδοχείς LPA στα κοκκώδη κύτταρα καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια Gi και ERK/p38 συμμετέχουν στο κλείσιμο των χασματοσυνδέσμων ανάμεσα στα κοκκώδη κύτταρα και το ωάριο, γεγονός που οδηγεί σε πρόωρη μείωση των επιπέδων cAMP του ωαρίου με αποτέλεσμα την προώθηση της πυρηνικής ωρίμανσης in vitro (Komatsu et al., 2006).

Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι η μείωση του επίπεδα cAMP στο εσωτερικό του ωαρίου μέσω LPA θεραπεία μπορεί να προωθήσει την πυρηνική ωρίμανση των ωοκυττάρων ποντικού in vitro. Στη συνέχεια ελέγχτηκε η επίδραση διαφορετικών ποσοτήτων LPA σε ανώριμα ωάρια

ποντικού (0, 1, 10, 30, 50 και 100 μM). Τα ποσοστά ωρίμανσης αυξανόταν όσο οι συγκεντρώσεις αυξάνονταν μέχρι και τα 30 μM ενώ παρατηρήθηκε μείωση των ποσοστών ωρίμανσης σε συγκεντρώσεις 50 και 100 μM . Εν κατακλείδι, φαίνεται ότι το LPA έχει θετικά αποτελέσματα κατά την IVM σε ένα μοντέλο ποντικού. Η προσθήκη του LPA στα καλλιεργητικά μέσα, ιδιαίτερα σε 30 μM , βελτιώνει την ωρίμανση των ωαρίων, τη γονιμοποίηση και την επακόλουθη ανάπτυξη βλαστοκύστης. (Jo et al., 2014) Η προσθήκη LPA στο καλλιεργητικό μέσο ωρίμανσης ωαρίων βοοειδών αυξάνει τα μεταγγραφα κάποιων γονιδίων - δεικτών όπως το FST και το GDF9, προωθεί μια αντιαποπτωτική ισορροπία στην μεταγραφή γονιδίων που εμπλέκονται στην απόπτωση (BCL2 και BAX) και μειώνει τη μεταγραφή των γονιδίων των κυττάρων του ωοφόρου δίσκου που σχετίζονται με χαμηλή βιωσιμότητα (CTSS). Παρ' όλα αυτά δε φαίνεται να επηρεάζεται η ανάπτυξη παρά μόνο μετά το στάδιο της βλαστοκύστης (Boruszweska et al., 2014).



Εικόνα 4: Πιθανός μηχανισμός δράσης του LPA στην ωρίμανση ανώριμων ωαρίων (Tokumura, 2002)

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση του LPA σε ανθρώπινα ανώριμα ωοκύτταρα προερχόμενα από διεγερμένους κύκλους IVF τα οποία έχουν απογυμνωθεί από τα κοκκώδη κύτταρα που τα περιβάλλουν. Δεν υπάρχουν προηγούμενες μελέτες της επίδρασης του λυσοφωσφατιδικού οξέος σε ωρίμανση ανθρώπινων ωαρίων.

2. Μεθοδολογία

2.1. Δειγματοληψία

Για το πειραματικό μέρος συλλέχθηκαν ανώριμα ωάρια (GV και MI) γυναικών ηλικίας από 25 έως 45 ετών από διεγερμένους κύκλους ωοθυλακιορρηξίας - μικρογονιμοποίησης που έλαβαν χώρα στη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής της Μαιευτικής-Γυναικολογικής Κλινικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα 2013-2014.

2.2. Επίδραση του Lysophosphatidic acid (LPA) στην ωρίμανση ανώριμων ωαρίων

2.2.1. Υλικά και όργανα

- Τριβλία 5 οπών
- Τριβλία καλλιέργειας εμβρύων
- πιπέτες 1-10 μl, 20-100 μl
- διάλυμα Dulbecco's PBS (Sigma Aldrich)
- διάλυμα ανθρώπινης αλβουμίνης ορού 80mg/ml (Sigma Aldrich)
- Oleoyl-L-α-lysophosphatidic acid sodium salt (Sigma Aldrich)
- καλλιεργητικό μέσο για ανάπτυξη εμβρύων έως το στάδιο της βλαστοκύστης με προσθήκη ανθρώπινης αλβουμίνης ορού 5mg/ml Continuous Single Culture™ Complete (Irvine Scientific)
- υαλουρονιδάση (Irvine Scientific)
- μικροσκόπιο αντίστροφης φάσης

2.2.2. Επιλογή προϊόντος LPA

Μετά από σύγκριση ανάμεσα στις εταιρίες που παρέχουν τον συγκριμένο παράγοντα επιλέχθηκε το προϊόν Oleoyl-L-α-lysophosphatidic acid sodium

salt της Sigma-Aldrich σε σκόνη με μοριακό βάρος 459,51 g/mol και καθαρότητα ίση με 98%. Το προϊόν φυλάσσεται στους -20 °C

2.2.3. Προετοιμασία αντιδραστηρίων

Ανασύσταση του LPA

Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή το άλας Oleyl-LPA διαλύεται εύκολα σε ποσότητες 5 mg/ml (11 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς ασβέστιο και μαγνήσιο. Διάλυση μπορεί να γίνει και σε ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικά άλατα (PBS) με pH 7,2, σε συγκεντρώσεις μέχρι και 0.3 mM (0.14 mg/ml) παρουσία 0.1% (w/v) αλβουμίνη βόειου ορού ελεύθερη από λιπαρά οξέα (BSA) . Χρησιμοποιήθηκε στην προκειμένη περίπτωση ως διαλύτης διάλυμα PBS με περιεκτικότητα 0,1 % σε HSA. Για τον εμπλουτισμό του διαλύματος σε πρωτεΐνη χρησιμοποιήθηκε διάλυμα περιεκτικότητας σε HSA 80 mg/ml. Για 15 ml διαλύματος PBS που χρειάστηκε, η ποσότητα του HSA που αναλογεί είναι 15 mg. Άρα για τον εμπλουτισμό του σε πρωτεΐνη χρειάστηκαν 187,5 μl διαλύματος πρωτεΐνης . Έτσι με προσθήκη 187,5 μl διαλύματος πρωτεΐνης σε 14812,5 μL DPBS παρασκευάστηκαν 15 ml DPBS 0,1% HSA.

Τα 5 mg της σκόνης LPA που χρησιμοποιήθηκαν είναι διαλυτά σε 1 ml διαλύτη. Μετά την πρώτη αραίωση έγινε περαιτέρω αραίωση με προσθήκη 9 ml διαλύτη καταλήγοντας σε διάλυμα περιεκτικότητας 5 mg LPA σε 10 ml διαλύτη DPBS (C=0,5 mg/ml)

Ποσότητα του παράγοντα που χρησιμοποιήθηκε

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σε ασθενείς που υπόκεινται σε IVF οι φυσιολογική ποσότητα σε LPA του ωοθυλακικού υγρού κυμαίνεται σε επίπεδα 25,3 +/- 3,6 nmol/ml (Tokomura et al., 1999). Ακόμη σε πειράματα που γίνανε σε ποντίκια οι ποσότητες του παράγοντα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της ίδιας περίπου τάξεως.

Χρησιμοποιώντας τον τύπο $C_A V_A = C_T V_T$

Όπου

C_A = η συγκέντρωση του παράγοντα στο διάλυμα

V_A = ο όγκος διαλύματος που πρέπει να χρησιμοποιηθεί

C_T = η επιθυμητή συγκέντρωση του παράγοντα στη σταγόνα καλλιέργειας σύμφωνα με τα βιβλιογραφικά δεδομένα

V_T = ο όγκος της σταγόνας καλλιέργειας

Έχουμε

$$C_A = n/V = (m/MB)/V = 5 \cdot 10^{-3} \text{ gr} / 459.51 \cdot 10^{-3} \text{ M} = 1.1 \text{ mM}$$

$$C_T = 25 \cdot 10^{-9} \text{ mol} / 10^{-3} \text{ lt} = 25 \cdot 10^{-6} \text{ M}$$

$$V_T = 50 \text{ }\mu\text{l}$$

$$\text{Άρα } 1,1 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_A = 25 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot 50 \text{ }\mu\text{l} \rightarrow V_A = 1,13 \text{ }\mu\text{l}$$

Άρα η σταγόνα καλλιέργειας πρέπει να περιέχει 1,13 μl LPA και 48,87 μl καλλιεργητικού υλικού.

2.2.4. Αναλυτική τεχνική

Συλλογή ωαρίων

Η ωοληψία πραγματοποιήθηκε μετά από διέγερση των ωοθηκών για παραγωγή ωαρίων. Κατά τη διέγερση των ωοθηκών γίνεται απευαισθητοποίηση της υπόφυσης με χορήγηση GnRH αγωνιστή ή ανταγωνιστή και χορήγηση γοναδοτροπινών ώστε να γίνει επιλογή και ανάπτυξη περισσοτέρων του ενός ωοθυλακίων. Η παρουσία 3 ή περισσοτέρων ωοθυλακίων μεγέθους ίσο ή μεγαλύτερο των 17 mm αποτελεί δείκτη για την τελική ωοθυλακική ωρίμανση, η οποία γίνεται με τη χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης που οδηγεί σε μια κατάσταση αντίστοιχη με το ενδογενές κύμα της LH. Έτσι τα ωάρια εντός των ωοθυλακίων ωριμάζουν και 36 ώρες μετά γίνεται η ωοληψία ώστε να μην έχει προλάβει να γίνει ωοθυλακιόρρηξη. Τα πρωτόκολλα που ακολουθήθηκαν ήταν τόσο το Βραχύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή όσο και το Μακρύ πρωτόκολλο με GnRH αγωνιστή.

Βραχύ πρωτόκολλο διέγερσης με GnRH αγωνιστή

Με βάση αυτό το πρωτόκολλο από τη 2^η μέρα του κύκλου χορηγήθηκε GnRH ανάλογο το οποίο συνδέεται στην υπόφυση με αποτέλεσμα τη απευαισθητοποίηση της μετά από περίπου μια βδομάδα χορήγησης του σκευάσματος. Ταυτόχρονα με τη χορήγηση του αγωνιστή ξεκίνησε και η χορήγηση γοναδοτροπινών εκμεταλλευόμενοι έτσι και την αρχική αύξηση της ενδογενούς FSH. Την 6^η μέρα έγινε έλεγχος των επιπέδων της οιστραδιόλης στο αίμα ώστε να ελεγχθεί η απάντηση των ωοθηκών (400 pg/ml υποδηλώνουν καλή απάντηση της ωοθήκης) στη διέγερση και την 8^η μέρα έγινε υπερηχογραφικός έλεγχος για τον αριθμό και το μέγεθος των ωοθυλακίων. Έτσι την 10-11 ημέρα έγινε χορήγηση χοριακής γοναδοτροπίνης και 36 ώρες μετά η ωοληψία.

Μακρύ πρωτόκολλο διέγερσης με GnRH αγωνιστή

Σε αυτό το πρωτόκολλο έχουμε πρώτα απευαισθητοποίηση της υπόφυσης και στη συνέχεια διέγερση. Εμφανίζεται με δυο μορφές: ωχρινικό όπου η χορήγηση του αγωνιστή γίνεται από την 21^η μέρα του κύκλου και ωοθυλακικό όπου η χορήγηση του αγωνιστή ξεκινά τη 2^η μέρα του κύκλου. Για 12 μέρες χορηγήθηκε μόνο GnRH ανάλογο και στη συνέχεια μετά από έλεγχο ότι έχει μειωθεί τόσο η οιστραδιόλη όσο και η LH ξεκίνησε και η -ταυτόχρονη με τον αγωνιστή- χορήγηση γοναδοτροφινών. Από εκεί και πέρα η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι ίδια με εκείνη στο short πρωτόκολλο.

Προσθήκη LPA και παρακολούθηση των ωαρίων

Κατά την ωοληψία συλλέχθηκαν τα ωοθυλάκια με το ωοθυλακικό υγρό και απομονώθηκαν τα ωάρια. Τα ωάρια συλλέχθηκαν και τοποθετηθήκαν σε 750 μl καλλιεργητικού υλικού για τη γονιμοποίηση για περίπου δυο ώρες σε κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας (37 °C και 5% CO₂). Στη συνέχεια με χρήση υαλουρονιδάσης (50 μl) και με τη μηχανική πίεση της πιπέτας έγινε η απογύμνωση των ωαρίων από τα κοκκώδη κύτταρα και ο έλεγχος αν πρόκειται για ώριμα (MII) ή ανώριμα ωάρια. Τα ανώριμα ωάρια

διαχωρίστηκαν σε δυο κατηγορίες: εκείνα χωρίς πολικό σωματίο και χωρίς εμφανή πυρηνική δομή (MI) και εκείνα χωρίς πολικό σωματίο και με εμφανή δομή βλαστικού κυστιδίου (germinal vesicle - GV). Τα ανώριμα ωάρια τοποθετήθηκαν σε σταγόνα καλλιεργητικού υλικού ποσότητας 50μl, η οποία περιείχε 48,87 μl CSCC και 1,13 μl LPA.

Σε μικροσκόπιο αντίστροφης φάσης παρακολουθήθηκε η επίδραση του παράγοντα LPA στην ωρίμανση των ωαρίων. Γνωρίζοντας μέσω της χρήσης τεχνολογίας time-lapse ότι ανώριμα ωάρια τα οποία βρίσκονται σε καλλιέργεια με θρεπτικό υλικό σε κατάλληλες συνθήκες γίνεται GVBD 6,4 ώρες μετά την απομάκρυνση των κοκκωδών κυττάρων και εκβολή του πρώτου πολικού σωματίου στις 20,7 ώρες (Escrich et al., 2012) έγινε έλεγχος των ωαρίων τη στιγμή της τοποθέτησης του παράγοντα και στη συνέχεια σε διάστημα 2, 4, 6, 8 και 12, 18 και 24 ωρών ,ανάλογα, από την προσθήκη του LPA ώστε να παρατηρηθεί εάν η παρουσία του παράγοντα έχει θετική ή αρνητική επίδραση στην ωρίμανση τους. Το ίδιο συνέβη και στα δείγματα - μάρτυρες τα οποία είχαν τοποθετηθεί μόνο σε καλλιεργητικό υλικό (CSCC).

3. Αποτελέσματα

3.1. Περιγραφή δείγματος

Κατά το χρονικό διάστημα από 10/04/2014 ως 24/06/2012 συλλέχτηκαν συνολικά 7 δείγματα ανώριμων ωαρίων από τη Μονάδα Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας. Τα 6 από τα 7 δείγματα ήταν ανώριμα ωάρια στο στάδιο του βλαστικού κυστιδίου (GV) ενώ το 1 ήταν ανώριμο ωάριο στο στάδιο της μετάφασης Ι (MI). Αναλυτικά τα στοιχεία των δειγμάτων παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Εκτός των παραπάνω δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν και 5 δείγματα ελέγχου (control) τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Η ταυτότητα των δειγμάτων είναι απόρρητη και χρησιμοποιήθηκε μόνο από την ομάδα που τα μελέτησε.

Πίνακας 1: Δείγματα ανώριμων ωαρίων στα οποία προστέθηκε LPA

α/α	Ηλικία γυναίκας	BMI γυναίκας	Πρωτόκολλο	Αριθμός ωαρίων	Αριθμός GV/MI
1	45	19,98	Βραχύ	2	1/0
2	25	23,53	Βραχύ	8	1/0
3	43	23,83	Μακρύ	7	2/0
4	36	22,31	Βραχύ	8	3/0
5	28	18,59	Βραχύ	10	1/2
6	37	24,35	Βραχύ	12	3/0
7	30	31,52	Μακρύ	16	3/0

Πίνακας 2: Δείγματα ελέγχου (control)

α/α	Ηλικία γυναίκας	BMI γυναίκας	Πρωτόκολλο	Αριθμός ωαρίων	Αριθμός GV
1	33	34,02	Μακρύ	6	1
2	37	23,44	Βραχύ	6	3
3	37	23,44	Βραχύ	6	3

4	27	17,72	Βραχύ	9	2
5	36	19	Βραχύ	8	2

3.2. Αναλυτικά αποτελέσματα

Για κάθε δείγμα ακολούθησε παρατήρηση από τη στιγμή της προσθήκης του LPA και σε τακτά χρονικά διαστήματα. Σημειώθηκαν τόσο η ώρα κατά την οποία είχε γίνει η χορήγηση της χοριακής γοναδοτροπίνης καθώς και η ώρα λήψης των ωαρίων, η στιγμή της απογύμνωσης από τα κοκκώδη κύτταρα, η ώρα προσθήκης του παράγοντα. Στη συνέχεια και μετά από κάθε παρατήρηση του δείγματος σημειωνόταν η ώρα παρατήρησης και η φάση ωρίμανσης στην οποία βρισκόταν εκείνη τη χρονική στιγμή το ωκύτταρο (GV, MI, MII). Υπολογίστηκε η διάρκεια από την ώρα της χορήγησης της χοριακής γοναδοτροπίνης ως την ώρα της ωρίμανσης καθώς και η διάρκεια από την ώρα της προσθήκης του LPA ως την ώρα ωρίμανσης. Ως ενδιάμεσο αποτελέσματα υπολογίστηκε και η χρονική διάρκεια από την προσθήκη του LPA ώσπου το ωάριο να φτάσει στη μετάφαση I (MI). Οι παρατηρήσεις αυτές παρουσιάζονται στον Πίνακα 3 αναλυτικά. Οι ίδιες παρατηρήσεις καταγράφηκαν και στην περίπτωση των control (Πίνακας 4) ώστε να υπάρξει σύγκριση στην επίδραση του LPA στην ωρίμανση των δειγμάτων.

Πίνακας 3: Αναλυτικά αποτελέσματα της προσθήκης LPA σε ανώριμα ωάρια

	1	2	3	4	5	6	7
hCG	22:30	21:30	23:00	22:30	22:30	21:30	22:30
Oocyte Retrieval	10:00	10:00	10:30	10:30	10:00	8:30	9:30
Denudation	12:00	12:00	12:30	14:00	14:00	11:30	13:00
Προσθήκη LPA	12:15	12:30	13:00	15:00	15:00	12:00	13:30
1η παρατήρηση	12:15	12:30	13:00	15:00	15:00	12:00	13:30
	GV	GV	GV	GV	MI	GV	GV
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-1	37,75	39	38	40,5	40,5	38,5	39
2η παρατήρηση	14:15	15:00	18:30	18:30	18:30	15:00	18:00
	GV	GV	GV	GV	MI	GV	GV
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-2	39,75	41,5	43,5	44	44	41,5	43,5

3η παρατήρηση	16:40	17:00	7:00	7:30	7:30	18:00	20:00
	GV	GV	MI	MI	MII	GV	MI
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-3	42	43,5	56	55	55	44,5	45,5
4η παρατήρηση	10:00	7:00	11:00	12:00	12:00	8:30	8:30
	MI	MI	MI	MI	MII	MI	MII
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-4	59,5	57,5	60	59,5	59,5	59	58
5η παρατήρηση	13:00	10:00	16:00	15:00	15:00	11:00	
	MI	MI	MII	MII	MII	MII	
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-5	62,5	60,5	65	62,5	62,5	61,5	
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-PB			65	62,5	44	61,5	58
ΠΡΟΣΘΗΚΗ LPA-PB	---	---	27	24		23	19

Πίνακας 4: Αναλυτικά αποτελέσματα για τα control

	1	2	3	4	5
hCG	22:30	21:00	21:00	22:00	23:00
Oocyte Retrieval	9:30	11:00	11:00	10:00	11:00
Denudation	13:30	14:00	14:00	11:30	14:30
1η παρατήρηση	13:30	14:00	14:00	11:30	14:30
	GV	GV	GV	GV	GV
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-1	39	41	41	37,5	39,5
2η παρατήρηση	8:30	8:00	8:00	7:30	7:30
	MI	MI	MI	MI	MI
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-2	58	59	59	57,5	56,5
3η παρατήρηση	13:30	10:00	10:00	9:30	11:30
	MI	MI	MI	MI	MI
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-3	63	61	61	59,5	60,5
4η παρατήρηση	13:30	13:00	13:00	11:30	14:30
	MI	MII	MI	MII	MII
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-4	87	64	64	61,5	63,5
ΔΙΑΡΚΕΙΑ hCG-PB		64		61,5	63,5
DENUATION-PB		23		24	24

3.3. Σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα δείγματα με προσθήκη LPA και στα control

Οι ώρες που χρειάστηκαν για την ωρίμανση των ωαρίων στα οποία προστέθηκε LPA και οι ώρες που πέρασαν ως την ωρίμανση των δειγμάτων control συγκεντρώθηκαν και υπολογίστηκε η μέση τιμή για κάθε ομάδα δειγμάτων (Πίνακας 5). Στη συνέχεια ακολούθησε T-test για ανεξάρτητα δείγματα το αποτέλεσμα του οποίου έδειξε ότι η χρονική διαφορά ανάμεσα στις ώρες για την ωρίμανση με προσθήκη LPA σε σύγκριση με εκείνες των δειγμάτων control δεν παρουσιάζουν στατιστικά σημαντική διαφορά ($p\text{-value} = 0,819$).

Παρατηρήθηκε ακόμα ότι στα δείγματα control ωρίμασε ένα ποσοστό 60% των δειγμάτων, γεγονός που ήταν αναμενόμενο σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ενώ στα δείγματα που προστέθηκε LPA το ποσοστό ωρίμανσης ήταν της τάξεως του 66,67%, υψηλότερο σε μικρό βαθμό δηλαδή από εκείνο με χρήση μόνο καλλιεργητικού υλικού. Όσο αναφορά τις χρονικές στιγμές κατά τις οποίες έγινε η κατάτμηση του βλαστικού κυστιδίου αυτό συνέβη κοντά στις ώρες που δίνονται από τη βιβλιογραφία (6 περίπου ώρες) (Escrich et al., 2012).

Στο δείγμα μας που ήταν ήδη MI κατά τη στιγμή της ανάκτησης παρατηρήσαμε ότι χρειάστηκε μικρό χρονικό διάστημα ώστε να γίνει MII δε γνωρίζουμε όμως αν αυτό οφείλεται στην επίδραση του LPA ή όχι.

Πίνακας 5: Μέσος όρος χρονικού διαστήματος ωρίμανσης σε ώρες

α/α	Χρονικό διάστημα ως την εμφάνιση πολικού σωματίου (ώρες)	
	Δείγματα με προσθήκη LPA	Control
1	---	---
2	---	23
3	27	---
4	24	24

5	23	24
6	---	
7	19	
Μέσος όρος	23,25	23,67

5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στη χρήση ή όχι LPA για την ωρίμανση δεν είναι στατιστικά σημαντικές. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι το LPA, αντίθετα με τα αποτελέσματα στα ζωικά μοντέλα που έχουν μελετηθεί ως τώρα, δεν ευνοεί την *in vitro* ωρίμανση των ανθρώπινων ωαρίων.

Γνωρίζουμε ότι η δράση του LPA σε προηγούμενες μελέτες γινόταν μέσω των κοκκωδών κυττάρων. Πιο συγκεκριμένα η σύνδεση του LPA στους υποδοχείς που υπάρχουν στα κοκκώδη κύτταρα ενεργοποιεί τα σηματοδοτικά μονοπάτια Gi και ERK/p38 με αποτέλεσμα το κλείσιμο των χασματοσυνδέσμων ανάμεσα στα κοκκώδη κύτταρα και το ωάριο, γεγονός που οδηγεί σε πρόωρη μείωση των επιπέδων cAMP του ωαρίου με αποτέλεσμα την προώθηση της πυρηνική ωρίμανσης *in vitro* (Komatsu et al., 2006). Οι υποδοχείς του LPA βρίσκονται στα κοκκώδη κύτταρα άρα η δράση του, απουσία τους, δεν επηρεάζει την ωοκυτταρική ωρίμανση κάτι το οποίο παρατηρήθηκε και σε ωάρια ποντικών που είχαν απογυμνωθεί (Hinokio et al., 2002).

Επιπρόσθετα, σε προηγούμενες μελέτες φάνηκε ότι το λυσοφωσφατιδικό οξύ (LPA) προκαλεί την ενεργοποίηση ροής Cl⁻ επαγόμενη από CA²⁺ σε απογυμνωμένα ωοκύτταρα του *Xenopus laevis*. Η απόκριση φαίνεται να γίνεται μέσω ενός ειδικού μεμβρανικού υποδοχέα, επειδή δεν παρατηρείται επαγωγή ροής επάγεται όταν σχετικές ενώσεις: φωσφατιδικό οξύ (PA), λυσοφωσφατιδυλοχολίνη (LPC), και λυσοφωσφατιδυλοσερίνη (LPS), εφαρμόζονται εξωκυτταρικά ή όταν το LPA ενγχέεται ενδοκυτταρικά. Η απόκριση αυτή είναι δόσοεξαρτώμενη για συγκεντρώσεις LPA από 10⁽⁻⁸⁾ έως 10⁽⁻³⁾ M. Κατά συνέπεια φαίνεται ότι η επώαση των ωοκυττάρων σε LPA δεν επάγει την κατάτμηση του βλαστικού κυστιδίου και την ωρίμανση του ωαρίου. Φαίνεται ακόμα ότι η απόκριση αυτή οφείλεται σε έναν ειδικό μεμβρανικό υποδοχέα που επάγει την τοξική αντίδραση (Durieux et al., 1992)

Φαίνεται ακόμα ότι υποδοχείς για το LPA δεν υπάρχουνε στα ανώριμα ωάρια αλλά εμφανίζονται κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη με αποτέλεσμα η παρουσία του λυσοφωσφατιδικού οξέος να παίζει ρόλο μετά τη γονιμοποίηση και πιο συγκεκριμένα μετά το στάδιο της βλαστοκύστης (Liu and Armant, 2004).

Τα δείγματα μας με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν ως control δεν παρουσιάζουν κατά μέσο όρο διαφορά στα βασικά τους χαρακτηριστικά δηλαδή την ηλικία και το BMI της γυναίκας, κάτι που θα μπορούσε να επηρεάσει την ποιότητα τους ή την απόκριση τους στην ωρίμανση. Λόγω της μικρής ποσότητας δειγμάτων δε μπορούμε να εξάγουμε ασφαλή συμπεράσματα για την επίδραση του LPA φαίνεται όμως πως τόσο από το στάδιο του GV στο στάδιο του MI όσο και από το στάδιο του MI στο στάδιο του MII ο χρόνος που χρειάστηκε για την ωρίμανση είναι παρόμοιος με εκείνον που αναφέρεται στη βιβλιογραφία όταν τα ανώριμα ωάρια αφήνονται να ωριμάσουν μόνα τους σε καλλιεργητικό υλικό άνευ προσθήκης κάποιου παράγοντα. Ακόμα και το ποσοστό εκείνων που έφτασαν στην ωρίμανση δεν απέχει από αυτά τα οποία θα ωριμάζανε και χωρίς την προσθήκη του LPA (Escrich et al., 2012).

Ως περαιτέρω μελέτες θα μπορούσαν να προταθούν τόσο η χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων του LPA ώστε να ελέγξουμε αν μικρότερη συγκέντρωση θα μπορούσε να έχει θετική επίδραση στην ωρίμανση. Ακόμα δε γνωρίζουμε αν σε ανθρώπινα ωοκύτταρα από τα οποία δεν έχουν απομακρυνθεί τα κοκκώδη κύτταρα λειτουργεί ο ίδιος μηχανισμός με εκείνον στα τρωκτικά και έτσι θα μπορούσαμε να ελέγξουμε αν η επίδραση του LPA σε σύμπλεγμα κοκκωδών κυττάρων – ανώριμου ωαρίου εμφανίζει θετικά για την ωρίμανση αποτελέσματα.

5. Βιβλιογραφία

Έντυπη Βιβλιογραφία

- Aitken, R. J., D. Harkiss and D. Buckingham (1993). "Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function." Journal of Reproduction and Fertility **98**(1): 257-265.
- Albertini, D. F., A. Sanfins and C. M. H. Combelles (2003). "Origins and manifestations of oocyte maturation competencies." Reproductive BioMedicine Online **6**(4): 410-415.
- Ali, A., J. F. Bilodeau and M. A. Sirard (2003). "Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development." Theriogenology **59**(3): 939-949.
- Ali, A., K. Coenen, D. Bousquet and M. A. Sirard (2004). "Origin of bovine follicular fluid and its effect during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes." Theriogenology **62**(9): 1596-1606.
- Ali, A., L. Massicotte and M. A. Sirard (2002). "Effects of hyaluronic acid during in vitro maturation on further development of bovine oocytes." Biology of Reproduction **66**: 207-212.
- Ali, A., F. Paradis, C. Vigneault and M. A. Sirard (2005). "The potential role of gap junction communication between cumulus cells and bovine oocytes during in vitro maturation." Molecular Reproduction and Development **71**(3): 358-367.
- Ali, A. and M. A. Sirard (2002). "Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocytes during in vitro maturation." Biology of Reproduction **66**(4): 901-905.
- Ali, A. and M. A. Sirard (2002). "The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes." Zygote **10**(1): 65-71.
- An, S., T. Bleu, O. G. Hallmark and E. J. Goetzl (1998). "Characterization of a novel subtype of human G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid." J Biol Chem **273**(14): 7906-7910.
- Anderiesz, C. and A. O. Trounson (1995). "Fertilization and early embryology: The effect of testosterone on the maturation and developmental capacity of murine oocytes in vitro." Human Reproduction **10**(9): 2377-2381.
- Assey, R. J., P. Hyttel, T. Greve and B. Purwantara (1994). "Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles." Molecular Reproduction and Development **37**(3): 335-344.
- Baker, D. L., E. S. Umstot, D. M. Desiderio and G. J. Tigyi (2000). "Quantitative Analysis of Lysophosphatidic Acid in Human Blood Fractions." Annals of the New York Academy of Sciences **905**(1): 267-269.
- Baker, S. J. and N. Spears (1999). "The role of intra-ovarian interactions in the regulation of follicle dominance." Human Reproduction Update **5**(2): 153-165.
- Bandoh, K., J. Aoki, H. Hosono, S. Kobayashi, T. Kobayashi, K. Murakami-Murofushi, M. Tsujimoto, H. Arai and K. Inoue (1999).

"Molecular cloning and characterization of a novel human G-protein-coupled receptor, EDG7, for lysophosphatidic acid." J Biol Chem **274**(39): 27776-27785.

- Barnes, F. L., A. Crombie, D. K. Gardner, A. Kausche, O. Lacham-Kaplan, A. M. Suikkari, J. Tiglias, C. Wood and A. O. Trounson (1995). "Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching." Human Reproduction **10**(12): 3243-3247.
- Barnes, F. L., A. Kausche, J. Tiglias, C. Wood, L. Wilton and A. Trounson (1996). "Production of embryos from in vitro-matured primary human oocytes." Fertil Steril **65**(6): 1151-1156.
- Belin, F., G. Goudet, G. Duchamp and N. Gérard (2000). "Intrafollicular Concentrations of Steroids and Steroidogenic Enzymes in Relation to Follicular Development in the Mare." Biology of Reproduction **62**(5): 1335-1343.
- Blondin, P., D. Bousquet, H. Twagiramungu, F. Barnes and M.-A. Sirard (2002). "Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes." Biology of Reproduction **66**(1): 38-43.
- Boruszewska, D., A. C. Torres, I. Kowalczyk-Zieba, P. Diniz, M. Batista, L. Lopes-da-Costa and I. Woclawek-Potocka (2014). "The Effect of Lysophosphatidic Acid during In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Embryonic Development and mRNA Abundances of Genes Involved in Apoptosis and Oocyte Competence." Mediators of Inflammation **2014**: 12.
- Brower, P. and R. Schultz (1982). "Intercellular communication between granulosa cells and mouse oocytes: existence and possible nutritional role during oocyte growth." Developmental Biology **90**: 144-153.
- Calder, M., A. Caveney, L. Smith and A. Watson (2003). "Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro." Reproductive Biology and Endocrinology **1**(1): 14.
- Calder, M. D., A. N. Caveney, M. A. Sirard and A. J. Watson (2005). "Effect of serum and cumulus cell expansion on marker gene transcripts in bovine cumulus-oocyte complexes during maturation in vitro." Fertility and Sterility **83**(4, Supplement): 1077-1085.
- Cha, K. Y. and R. C. Chian (1998). "Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use." Hum Reprod Update **4**(2): 103-120.
- Cha, K. Y., S. Y. Han, H. M. Chung, D. H. Choi, J. M. Lim, W. S. Lee, J. J. Ko and T. K. Yoon (2000). "Pregnancies and deliveries after in vitro maturation culture followed by in vitro fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome." Fertility and Sterility **73**(5): 978-983.
- Cha, K. Y., J. J. Koo, J. J. Ko, D. H. Choi, S. Y. Han and T. K. Yoon (1991). "Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program." Fertil Steril **55**(1): 109-113.
- Chen, S. U., C. H. Chou, K. H. Chao, H. Lee, C. W. Lin, H. F. Lu and Y. S. Yang (2008). "Lysophosphatidic Acid Up-Regulates Expression of Growth-

Regulated Oncogene- α , Interleukin-8, and Monocyte Chemoattractant Protein-1 in Human First-Trimester Trophoblasts: Possible Roles in Angiogenesis and Immune Regulation." Endocrinology **151**(1): 369-379.

- Chian, R. C., W. M. Buckett and S. L. Tan (2004). "In-vitro maturation of human oocytes." Reprod Biomed Online **8**(2): 148-166.
- Child, T. J., A. K. Abdul-Jalil, B. Gulekli and L. S. Tan (2001). "In vitro maturation and fertilization of oocytes from unstimulated normal ovaries, polycystic ovaries, and women with polycystic ovary syndrome." Fertility and Sterility **76**(5): 936-942.
- Choi, J. W., C.-W. Lee and J. Chun (2008). "Biological roles of lysophospholipid receptors revealed by genetic null mice: An update." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1781**(9): 531-539.
- Choi, Y. H., E. M. Carnevale, G. E. Seidel, Jr. and E. L. Squire (2001). "Effects of gonadotropins on bovine oocytes matured in TCM-199." Theriogenology **56**(4): 661-670.
- Comporti, M. (1989). "Three models of free radical-induced cell injury." Chemico-Biological Interactions **72**(1-2): 1-56.
- De Vos, A., H. Van de Velde, H. Joris and A. Van Steirteghem (1999). "In-vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection." Human Reproduction **14**(7): 1859-1863.
- Dekel, N., D. Galiani and W. H. Beers (1988). "Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: the response to gonadotropins at different stages of follicular development." Biology of Reproduction **38**(3): 517-521.
- Durieux, M. E., M. N. Salafranca, K. R. Lynch and J. R. Moorman (1992). "Lysophosphatidic acid induces a pertussis toxin-sensitive Ca^{2+} -activated Cl^- current in *Xenopus laevis* oocytes." Am J Physiol **263**(4 Pt 1): C896-900.
- Edwards, R. G. (1965). "Maturation in vitro of human ovarian oocytes." Lancet **2**(7419): 926-929.
- Eichholtz, T., K. Jalink, I. Fahrenfort and W. H. Moolenaar (1993). "The bioactive phospholipid lysophosphatidic acid is released from activated platelets." Biochem J **291** (Pt 3): 677-680.
- Emery, B. R., A. L. Wilcox, V. W. Aoki, C. M. Peterson and D. T. Carrell (2005). "In vitro oocyte maturation and subsequent delayed fertilization is associated with increased embryo aneuploidy." Fertility and Sterility **84**(4): 1027-1029.
- Eppig, J., M. Vivieros, C. Marin-Bivens and R. De La Fuente (2004). Regulation of mammalian oocyte maturation. In The Ovary. E. P. L. E. Adashi. Amsterdam, Elsevier Academic Press: 113-129.
- Eppig, J., K. Wigglesworth and F. Pendola (2002). "The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**: 2890-2894.
- Eppig, J. J., F. L. Pendola, K. Wigglesworth and J. K. Pendola (2005). "Mouse Oocytes Regulate Metabolic Cooperativity Between Granulosa Cells and Oocytes: Amino Acid Transport." Biology of Reproduction **73**(2): 351-357.

- Eppig, J. J., K. Wigglesworth and F. Chesnel (1993). "Secretion of Cumulus Expansion Enabling Factor by Mouse Oocytes: Relationship to Oocyte Growth and Competence to Resume Meiosis." Developmental Biology **158**(2): 400-409.
- Escribá, L., N. Grau, M. J. de los Santos, J. L. Romero, A. Pellicer and M. J. Escribá (2012). "The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes." Fertility and Sterility **98**(5): 1147-1151.
- Fortune, J. E. and W. Hansel (1985). "Concentrations of steroids and gonadotropins in follicular fluid from normal heifers and heifers primed for superovulation." Biology of Reproduction **32**(5): 1069-1079.
- Fourcade, O., M. F. Simon, C. Viodé, N. Rugani, F. Leballe, A. Ragab, B. Fournié, L. Sarda and H. Chap (1995). "Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells." Cell **80**(6): 919-927.
- Fowler, C. J. and B. A. Callingham (1978). "Substrate-selective activation of rat liver mitochondrial mono amine oxidase by oxygen." Biochemical Pharmacology **27**(16): 1995-2000.
- Fukushima, N., Y. Kimura and J. Chun (1998). "A single receptor encoded by vzg-1/lpA1/edg-2 couples to G proteins and mediates multiple cellular responses to lysophosphatidic acid." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(11): 6151-6156.
- Fukushima, N., J. A. Weiner and J. Chun (2000). "Lysophosphatidic Acid (LPA) Is a Novel Extracellular Regulator of Cortical Neuroblast Morphology." Developmental Biology **228**(1): 6-18.
- Gesta, S., M. F. Simon, A. Rey, D. Sibrac, A. Girard, M. Lafontan, P. Valet and J. S. Saulnier-Blache (2002). "Secretion of a lysophospholipase D activity by adipocytes: involvement in lysophosphatidic acid synthesis." Journal of Lipid Research **43**(6): 904-910.
- Gilchrist, R. B., P. L. Nayudu, M. A. Nowshari and J. K. Hodges (1995). "Meiotic competence of marmoset monkey oocytes is related to follicle size and oocyte-somatic cell associations." Biology of Reproduction **52**(6): 1234-1243.
- Haghighat, N. and L. J. Van Winkle (1990). "Developmental change in follicular cell-enhanced amino acid uptake into mouse oocytes that depends on intact gap junctions and transport system gly." Journal of Experimental Zoology **253**(1): 71-82.
- Hama, K., K. Bandoh, Y. Takehi, J. Aoki and H. Arai (2002). "Lysophosphatidic acid (LPA) receptors are activated differentially by biological fluids: possible role of LPA-binding proteins in activation of LPA receptors." FEBS Letters **523**(1): 187-192.
- Hanrahan, J. P., S. M. Gregan, P. Mulsant, M. Mullen, G. H. Davis, R. Powell and S. M. Galloway (2004). "Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*)." Biology of Reproduction **70**(4): 900-909.
- Hashimoto, S., K. Saeki, Y. Nagao, N. Minami, M. Yamada and K. Utsumi (1998). "Effects of cumulus cell density during in vitro maturation on the developmental competence of bovine oocytes." Theriogenology **49**(8): 1451-1463.

- Hecht, J. H., J. A. Weiner, S. R. Post and J. Chun (1996). "Ventricular zone gene-1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex." J Cell Biol **135**(4): 1071-1083.
- Hinokio, K., S. Yamano, K. Nakagawa, M. Iraharaa, M. Kamada, A. Tokumura and T. Aono (2002). "Lysophosphatidic acid stimulates nuclear and cytoplasmic maturation of golden hamster immature oocytes in vitro via cumulus cells." Life Sci **70**(7): 759-767.
- Homa, S. T. (1995). "Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte." Mol Reprod Dev **40**(1): 122-134.
- Huang, M.-C., H.-Y. Lee, C.-C. Yeh, Y. Kong, C. J. Zaloudek and E. J. Goetzl (2004). "Induction of protein growth factor systems in the ovaries of transgenic mice overexpressing human type 2 lysophosphatidic acid G protein-coupled receptor (LPA2)." Oncogene **23**(1): 122-129.
- Humblot, P., P. Holm, P. Lonergan, C. Wrenzycki, A. S. Lequarré, C. G. Joly, D. Herrmann, A. Lopes, D. Rizos, H. Niemann and H. Callesen (2005). "Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes." Theriogenology **63**(4): 1149-1166.
- Hunt, P. A. and T. J. Hassold (2008). "Human female meiosis: what makes a good egg go bad?" Trends in Genetics **24**(2): 86-93.
- Hussein, T. S., D. A. Froiland, F. Amato, J. G. Thompson and R. B. Gilchrist (2005). "Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins." J Cell Sci **118**(22): 5257-5268.
- Iga, K., K. Niwa and A. Bartke (1998). "Recombinant Bovine Growth Hormone Stimulates Nuclear Maturation of Bovine Oocytes *In Vitro* and Promotes Subsequent Embryonic Development." Journal of Reproduction and Development **44**(1): 45-52.
- Ishii, I., N. Fukushima, X. Ye and J. Chun (2004). "Lysophospholipid receptors: signaling and biology." Annu Rev Biochem **73**: 321-354.
- Izadyar, F., E. Zeinstra, B. Colenbrander, H. M. J. Vanderstichele and M. M. Bevers (1996). "In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of bovine activin A does not affect the number of embryos." Animal Reproduction Science **45**(1): 37-45.
- Jaroudi, K. A., J. M. Hollanders, U. V. Sieck, G. L. Roca, A. M. El-Nour and S. Coskun (1997). "Pregnancy after transfer of embryos which were generated from in-vitro matured oocytes." Hum Reprod **12**(4): 857-859.
- Jo, J. W., B. C. Jee, C. S. Suh and S. H. Kim (2014). "Addition of lysophosphatidic acid to mouse oocyte maturation media can enhance fertilization and developmental competence." Human Reproduction **29**(2): 234-241.
- Jurema, M. W. and D. Nogueira (2006). "In vitro maturation of human oocytes for assisted reproduction." Fertility and Sterility **86**(5): 1277-1291.
- Kim, B.-K., S.-C. Lee, K.-J. Kim, C.-H. Han and J.-H. Kim (2000). "In vitro maturation, fertilization, and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles." Fertility and Sterility **74**(6): 1153-1158.

- Kobayashi, T., S. Yamano, S. Murayama, H. Ishikawa, A. Tokumura and T. Aono (1994). "Effect of lysophosphatidic acid on the preimplantation development of mouse embryos." FEBS Letters **351**(1): 38-40.
- Komatsu, J., S. Yamano, A. Kuwahara, A. Tokumura and M. Irahara (2006). "The signaling pathways linking to lysophosphatidic acid-promoted meiotic maturation in mice." Life Sciences **79**(5): 506-511.
- Krisher, R. L. and B. D. Bavister (1998). "Responses of oocytes and embryos to the culture environment." Theriogenology **49**(1): 103-114.
- Kumar, T., Y. Wang and N. Lu (1997). "Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility." Nature Genetics **15**: 201-204.
- Kunikata, K., S. Yamano, A. Tokumura and T. Aono (1999). "Effect of lysophosphatidic acid on the ovum transport in mouse oviducts." Life Sciences **65**(8): 833-840.
- Le Du, A., I. J. Kadoch, N. Bourcigaux, S. Doumerc, M. C. Bourrier, N. Chevalier, R. Fanchin, R. C. Chian, G. Tachdjian, R. Frydman and N. Frydman (2005). "In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience." Hum Reprod **20**(2): 420-424.
- Lee, C.-W., R. Rivera, S. Gardell, A. E. Dubin and J. Chun (2006). "GPR92 as a New G12/13- and Gq-coupled Lysophosphatidic Acid Receptor That Increases cAMP, LPA5." Journal of Biological Chemistry **281**(33): 23589-23597.
- Leibfried-Rutledge, M. L., E. S. Critser and N. L. First (1986). "Effects of fetal calf serum and bovine serum albumin on in vitro maturation and fertilization of bovine and hamster cumulus-oocyte complexes." Biology of Reproduction **35**(4): 850-857.
- Leung, D. W. (2001). "The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases." Front Biosci **6**: 944-953.
- Li, R., R. J. Norman, D. T. Armstrong and R. B. Gilchrist (2000). "Oocyte-Secreted Factor(s) Determine Functional Differences Between Bovine Mural Granulosa Cells and Cumulus Cells." Biology of Reproduction **63**(3): 839-845.
- Liliom, K., Z. Guan, J. L. Tseng, D. M. Desiderio, G. Tigyi and M. A. Watsky (1998). "Growth factor-like phospholipids generated after corneal injury." Am J Physiol **274**(4 Pt 1): 1065-1074.
- Lin, M.-E., D. R. Herr and J. Chun (2010). "Lysophosphatidic acid (LPA) receptors: Signaling properties and disease relevance." Prostaglandins & Other Lipid Mediators **91**(3-4): 130-138.
- Liu, J., G. Lu, Y. Qian, Y. Mao and W. Ding (2003). "Pregnancies and births achieved from in vitro matured oocytes retrieved from poor responders undergoing stimulation in in vitro fertilization cycles." Fertility and Sterility **80**(2): 447-449.
- Liu, Z. and D. R. Armant (2004). "Lysophosphatidic acid regulates murine blastocyst development by transactivation of receptors for heparin-binding EGF-like growth factor." Experimental Cell Research **296**(2): 317-326.
- Lonergan, P., D. Rizos, A. Gutiérrez-Adán, P. M. Moreira, B. Pintado, J. de la Fuente and M. P. Boland (2003). "Temporal Divergence in the Pattern of Messenger RNA Expression in Bovine Embryos Cultured from the Zygote

- to Blastocyst Stage In Vitro or In Vivo." Biology of Reproduction **69**(4): 1424-1431.
- Luquain, C., A. Singh, L. Wang, V. Natarajan and A. J. Morris (2003). "Role of phospholipase D in agonist-stimulated lysophosphatidic acid synthesis by ovarian cancer cells." Journal of Lipid Research **44**(10): 1963-1975.
 - Mastroianni, L. and R. Jones (1965). "Oxygen tension within the rabbit fallopian tube." Journal of Reproduction and Fertility **9**(1): 99-102.
 - Matzuk, M. and D. Lamb (2002). "Genetic dissection of mammalian fertility pathways." Nat Cell Bio **4**: 41-49.
 - Mazereeuw-Hautier, J., S. Gres, M. Fanguin, C. Cariven, J. Fauvel, B. Perret, H. Chap, J. P. Salles and J. S. Saulnier-Blache (2005). "Production of Lysophosphatidic Acid in Blister Fluid: Involvement of a Lysophospholipase D Activity." J Invest Dermatol **125**(3): 421-427.
 - McNatty, K. P., J. L. Juengel, K. L. Reader, S. Lun, S. Myllymaa, S. B. Lawrence, A. Western, M. F. Meerasahib, D. G. Mottershead, N. P. Groome, O. Ritvos and M. P. E. Laitinen (2005). "Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function." Reproduction **129**(4): 473-480.
 - Mendoza, C., N. Cremades, E. Ruiz-Requena, F. Martinez, E. Ortega, S. Bernabeu and J. Tesarik (1999). "Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations." Human Reproduction **14**(3): 628-635.
 - Mendoza, C., E. Ruiz-Requena, E. Ortega, N. Cremades, F. Martinez, R. Bernabeu, E. Greco and J. Tesarik (2002). "Follicular fluid markers of oocyte developmental potential." Human Reproduction **17**(4): 1017-1022.
 - Mikkelsen, A. L. (2005). "Strategies in human in-vitro maturation and their clinical outcome." Reprod Biomed Online **10**(5): 593-599.
 - Moor, R., Y. Dai, C. Lee and J. Fulka (1998). "Oocyte maturation and embryonic failure." Human Reproduction Update **4**(3): 223-226.
 - Mori, K., J. Kitayama, J. Aoki, Y. Kishi, D. Shida, H. Yamashita, H. Arai and H. Nagawa (2007). "Submucosal connective tissue-type mast cells contribute to the production of lysophosphatidic acid (LPA) in the gastrointestinal tract through the secretion of autotaxin (ATX)/lysophospholipase D (lysoPLD)." Virchows Archiv **451**(1): 47-56.
 - Mori, T., T. Amano and H. Shimizu (2000). "Roles of Gap Junctional Communication of Cumulus Cells in Cytoplasmic Maturation of Porcine Oocytes Cultured In Vitro." Biology of Reproduction **62**(4): 913-919.
 - Motlik, J., J. Fulka and J.-E. Fléchon (1986). "Changes in intercellular coupling between pig oocytes and cumulus cells during maturation in vivo and in vitro." Journal of Reproduction and Fertility **76**(1): 31-37.
 - Nakane, S., A. Tokumura, K. Waku and T. Sugiura (2001). "Hen egg yolk and white contain high amounts of lysophosphatidic acids, growth factor-like lipids: distinct molecular species compositions." Lipids **36**(4): 413-419.
 - Nishiyama, T., K. Tachibana and T. Kishimoto (2010). Cytostatic Arrest: Post-Ovulation Arrest until Fertilization in Metazoan Oocytes. Oogenesis, John Wiley & Sons, Ltd: 357-384.

- Noguchi, K., S. Ishii and T. Shimizu (2003). "Identification of p2y9/GPR23 as a Novel G Protein-coupled Receptor for Lysophosphatidic Acid, Structurally Distant from the Edg Family." Journal of Biological Chemistry **278**(28): 25600-25606.
- Pages, C., M. Simon, P. Valet and J. S. Saulnier-Blache (2001). "Lysophosphatidic acid synthesis and release(1)." Prostaglandins **64**(1-4): 1-10.
- Pasternack, S. M., I. von Kugelgen, K. A. Aboud, Y. A. Lee, F. Ruschendorf, K. Voss, A. M. Hillmer, G. J. Molderings, T. Franz, A. Ramirez, P. Nurnberg, M. M. Nothen and R. C. Betz (2008). "G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth." Nat Genet **40**(3): 329-334.
- Pincus, G. and E. V. Enzmann (1935). "The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: the activation of ovarian eggs." J Exp Med **62**(5): 665-675.
- Pinkerton, J. H., K. D. Mc, E. C. Adams and A. T. Hertig (1961). "Development of the human ovary--a study using histochemical technics." Obstet Gynecol **18**: 152-181.
- Reynolds, L. P. and D. A. Redmer (2001). "Angiogenesis in the Placenta." Biology of Reproduction **64**(4): 1033-1040.
- Schroeder, A. C., R. M. Schultz, G. S. Kopf, F. R. Taylor, R. B. Becker and J. J. Eppig (1990). "Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of ZP2 to ZP2f during spontaneous mouse oocyte maturation in vitro in the absence of serum." Biology of Reproduction **43**(5): 891-897.
- Schuh, M. and J. Ellenberg (2007). "Self-Organization of MTOCs Replaces Centrosome Function during Acentrosomal Spindle Assembly in Live Mouse Oocytes." Cell **130**(3): 484-498.
- Shen, Z., J. Belinson, R. E. Morton, Y. Xu and Y. Xu (1998). "Phorbol 12-Myristate 13-Acetate Stimulates Lysophosphatidic Acid Secretion from Ovarian and Cervical Cancer Cells but Not from Breast or Leukemia Cells." Gynecologic Oncology **71**(3): 364-368.
- Shiokawa, S., K. Sakai, Y. Akimoto, N. Suzuki, H. Hanashi, S. Nagamatsu, M. Iwashita, Y. Nakamura, H. Hirano and Y. Yoshimura (2000). "Function of the Small Guanosine Triphosphate-Binding Protein RhoA in the Process of Implantation." The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism **85**(12): 4742-4749.
- Sirard, M. A., F. Roy, B. Patrick, P. Mermillod and L. A. Guilbault (1995). "Origin of the follicular fluid added to the media during bovine IVM influences embryonic development." Theriogenology **44**(1): 85-94.
- Skoura, A. and T. Hla (2009). "Lysophospholipid receptors in vertebrate development, physiology, and pathology." Journal of Lipid Research **50**(Supplement): 293-298.
- Soderstrom-Anttila, V., S. Makinen, T. Tuuri and A. M. Suikkari (2005). "Favourable pregnancy results with insemination of in vitro matured oocytes from unstimulated patients." Hum Reprod **20**(6): 1534-1540.
- Sugiura, T., S. Nakane, S. Kishimoto, K. Waku, Y. Yoshioka and A. Tokumura (2002). "Lysophosphatidic acid, a growth factor-like lipid, in the saliva." Journal of Lipid Research **43**(12): 2049-2055.

- Tabata, K.-i., K. Baba, A. Shiraishi, M. Ito and N. Fujita (2007). "The orphan GPCR GPR87 was deorphanized and shown to be a lysophosphatidic acid receptor." Biochemical and Biophysical Research Communications **363**(3): 861-866.
- Tadros, W., A. L. Goldman, T. Babak, F. Menzies, L. Vardy, T. Orr-Weaver, T. R. Hughes, J. T. Westwood, C. A. Smibert and H. D. Lipshitz (2007). "SMAUG Is a Major Regulator of Maternal mRNA Destabilization in Drosophila and Its Translation Is Activated by the PAN GU Kinase." Developmental Cell **12**(1): 143-155.
- Tanghe, S., A. Van Soom, H. Nauwynck, M. Coryn and A. de Kruif (2002). "Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization." Molecular Reproduction and Development **61**(3): 414-424.
- Tirone, E., C. D'Alessandris, V. C. Hascall, G. Siracusa and A. Salustri (1997). "Hyaluronan Synthesis by Mouse Cumulus Cells Is Regulated by Interactions between Follicle-stimulating Hormone (or Epidermal Growth Factor) and a Soluble Oocyte Factor (or Transforming Growth Factor β 1)." Journal of Biological Chemistry **272**(8): 4787-4794.
- Tokumura, A. (2002). "Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids **1582**(1-3): 18-25.
- Tokumura, A., T. Kume, K. Fukuzawa, M. Tahara, K. Tasaka, J. Aoki, H. Arai, K. Yasuda and H. Kanzaki (2007). "Peritoneal fluids from patients with certain gynecologic tumor contain elevated levels of bioactive lysophospholipase D activity." Life Sciences **80**(18): 1641-1649.
- Tokumura, A., M. Miyake, Y. Nishioka, S. Yamano, T. Aono and K. Fukuzawa (1999). "Production of Lysophosphatidic Acids by Lysophospholipase D in Human Follicular Fluids of In Vitro Fertilization Patients." Biology of Reproduction **61**(1): 195-199.
- Trounson, A., C. Wood and A. Kausche (1994). "In vitro maturation and the fertilization and developmental competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients." Fertil Steril **62**(2): 353-362.
- Trounson, A. A., C. Jones, G. (2001). "Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence." Reproduction **121**(1): 51-75.
- Van Blerkom, J. (2000). "Intrafollicular influences on human oocyte developmental competence: perifollicular vascularity, oocyte metabolism and mitochondrial function." Human Reproduction **15**(suppl 2): 173-188.
- van Tol, H. T., M. J. van Eijk, C. L. Mummery, R. van den Hurk and M. M. Bevers (1996). "Influence of FSH and hCG on the resumption of meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa." Mol Reprod Dev **45**(2): 218-224.
- Vanderhyden, B. C., J. N. Cohen and P. Morley (1993). "Mouse oocytes regulate granulosa cell steroidogenesis." Endocrinology **133**(1): 423-426.
- Veeck, L. L., J. W. Wortham, Jr., J. Witmyer, B. A. Sandow, A. A. Acosta, J. E. Garcia, G. S. Jones and H. W. Jones, Jr. (1983). "Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization." Fertil Steril **39**(5): 594-602.

- Wynn, P., H. M. Picton, J. A. Krapez, A. J. Rutherford, A. H. Balen and R. G. Gosden (1998). "Pretreatment with follicle stimulating hormone promotes the numbers of human oocytes reaching metaphase II by in-vitro maturation." Human Reproduction **13**(11): 3132-3138.
- Ye, X., K. Hama, J. J. A. Contos, B. Anliker, A. Inoue, M. K. Skinner, H. Suzuki, T. Amano, G. Kennedy, H. Arai, J. Aoki and J. Chun (2005). "LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing." Nature **435**(7038): 104-108.
- Zheng, P., B. Patel, M. McMenamin, E. Moran, A. M. Paprocki, M. Kihara, R. D. Schramm and K. E. Latham (2005). "Effects of Follicle Size and Oocyte Maturation Conditions on Maternal Messenger RNA Regulation and Gene Expression in Rhesus Monkey Oocytes and Embryos." Biology of Reproduction **72**(4): 890-897.

Διαδικτυακοί τόποι

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10008>
- https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=531126&loc=ec_rcs
- <http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/oogenesis.html>